

**Antischistosomal-aktive Dithiocarbamat-Derivate  
unter besonderer Berücksichtigung  
von Nitrogruppen-Bioisosteren  
und der Schwefelsäurediamid-Teilstruktur  
- Synthese und *in-vitro*-Testung -**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Georg Alexander Rennar, M. Sc.**

aus Celle

Marburg (Lahn) 2020

Erstgutachter:	Prof. Dr. Martin Schlitzer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Christoph G. Greveling
Drittgutachter:	Prof. Dr. Manfred Jung
Eingereicht am:	15. Oktober 2020
Tag der mündlichen Prüfung am:	04. Dezember 2020
Hochschulkennziffer:	1180

# **Band 1**

**Theoretischer Teil  
und *in-vitro*-Testungen**





# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Schistosomiasis.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Erreger .....	1
1.1.2 Krankheitsverlauf.....	5
1.1.3 Therapie der Schistosomiasis .....	7
1.2 Schwefelsäurediamide .....	29
1.2.1 Medizinalchemie .....	29
1.2.2 Synthese von Schwefelsäurediamiden .....	34
1.3 Die Nitro-Gruppe in der Medizinalchemie – Eigenschaften und Nitro-Drugs.....	43
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>52</b>
<b>3 Synthese, Testung und Diskussion.....</b>	<b>55</b>
3.1 Vorbemerkungen zu den biologischen Testungen.....	55
3.1.1 <i>In-vitro</i> -Testungen an <i>S. mansoni</i> .....	55
3.1.2 Messung der Zytotoxizität.....	61
3.2 Kombinationsserie 1 .....	66
1-(Methylsulfonylpiperazin)-Teilstruktur .....	67
Sulfonylpiperazin- bzw. Sulfamoylpiperazin-Teilstruktur .....	68
Aminosäurekonjugate der Dithiocarbamat-Derivate .....	71
<i>In-vitro</i> -Testung der Dithiocarbamat-Derivate mit Sulfonamid-Teilstruktur.....	77
<i>In-vitro</i> -Testung der Dithiocarbamat-Derivate mit Aminosäure-Teilstruktur .....	82
3.3 Sulfonamide.....	86
3.3.1 Phenylsulfonamid-Derivate mit einem Substituenten in <i>ortho</i> -, <i>meta</i> - oder <i>para</i> -Position .....	86
3.3.2 Phenylsulfonamid-Derivate mit mehreren Substituenten .....	112
3.3.3 Weitere aromatische Sulfonamid-Derivate .....	116
3.3.4 Heteroaromatische Sulfonamid-Derivate .....	123
3.3.5 Aliphatische und alizyklische Sulfonamid-Derivate.....	130
3.3.6 Aliphatische Sulfonamid-Derivate mit polarer Kopfgruppe .....	139
3.4 Schwefelsäurediamide .....	144
3.4.1 Sekundäre Amine als Ausgangssubstanz .....	144
3.4.2 Primäre Amine als Ausgangssubstanz .....	176
3.5 Harnstoffe und Thioharnstoffe .....	184

3.5.1	Syntheserouten zur Darstellung von Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivaten.....	184
3.5.2	Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivate am Piperazin-Teilgerüst.....	188
3.6	Kombinationsserie 2 .....	201
	Dithiocarbamate mit Sulfonamid-Teilstruktur.....	202
	Dithiocarbamat-Derivate mit Schwefelsäurediamid-Teilstruktur.....	207
	Dithiocarbamat-Derivate mit Harnstoff-/Thioharnstoff-Teilgerüst.....	213
3.7	Rückbau der Verbindung Schl-32.329 .....	220
3.7.1	Ersatz der Dithiocarbamatfunktion .....	220
3.7.2	Austausch des <i>para</i> -Nitrobenzyl-Substituenten.....	224
3.8	Ersatz der Nitro-Gruppe am Dithiocarbamat-Teilgerüst .....	227
3.8.1	Mono-Substitution am Benzolring mit gewöhnlichen Substituenten .....	227
3.8.2	Spezielle $\pi$ -Elektronenmangel-Substituenten (EWG's).....	230
3.8.3	Multisubstitution am Benzolring mit Halogenatomen .....	237
3.8.4	Planare Gruppen mit NO <sub>2</sub> -ähnlichen Akzeptor-Eigenschaften.....	241
3.8.5	Bioisostere .....	245
3.8.6	Kombination der bisher antischistosomal aktivsten Substituenten .....	247
3.8.7	$\pi$ -Elektronenarme Fünfring-Heteroaromaten .....	251
3.8.8	Ersatz des Nitrobenzyl-Restes durch andere Nitroaromaten.....	254
3.8.9	Variation der Substituenten im 4-Nitro- <i>ortho</i> -Kresol-Systems .....	256
3.9	Indol-Derivate.....	265
3.10	Endstufen-Synthesen im größeren Maßstab ( <i>Scale-up</i> ) .....	270
3.11	Weitergehende biologische Testungen.....	275
3.11.1	<i>In-vitro</i> -Langzeittestungen .....	275
3.11.2	Inhibitor-Auswaschung .....	280
3.11.3	Untersuchung der Schistosomen-Morphologie nach Behandlung mit Dithiocarbamat-Derivaten <i>via</i> Konfokal-Mikroskopie .....	285
3.11.4	<i>In-vitro</i> -Testung an Schistosomula (Somules).....	294
3.11.5	<i>In-vitro</i> -Testung an adulten Schistosomen der Art <i>S. japonicum</i> .....	297
3.12	<i>In-Silico</i> -Vorhersagen.....	300
3.12.1	ADME-Tox-Prediction .....	300
3.12.2	Molekulares Docking .....	315
3.13	<i>In-vitro</i> -Testung an anderen Helminthen.....	326
3.13.1	<i>In-vitro</i> -Testung gegen <i>Fasciola hepatica</i> .....	326
3.13.2	<i>In-vitro</i> -Testung gegen <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	329
3.14	Weitergehende Stoffklassen mit antischistosomalem Potenzial? .....	335
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>342</b>

<b>5</b>	<b>Referenzverzeichnis .....</b>	<b>358</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>378</b>
	Tabelle I: <i>In-vitro</i> -Testung an <i>S. mansoni</i> .....	378
	Tabelle II: Langzeit-Testung .....	562
	Tabelle III: Inhibitor-Auswaschung .....	567
	Tabelle IV: Schistosomula-Testung .....	573
	Tabelle V: Zytotoxizitätsmessungen .....	577
	Veröffentlichungen .....	592
	Lebenslauf .....	593
	Danksagung .....	595
	Eidesstattliche-Erklärung.....	597

## Abstract

### Antischistosomal Active Dithiocarbamate Derivatives with Focus on Nitro Group Bioisosters and the Partial Structure of Sulfuric Acid Diamide - Synthesis and *in-vitro*-Testing

Schistosomiasis is a neglected tropical disease and one of the most important parasitic diseases in terms of mortality and morbidity. The disease is caused through infection with blood flukes of the genus *Schistosoma*. More than 700 million people in over 78 countries live in endemic areas and more than 200,000 deaths a year are due to this disease. Currently there are only two drugs available to combat schistosomiasis, Praziquantel and Oxamniquine, with Oxamniquine being only partially effective. The intensive use of these drugs for several decades led to an increased probability of resistance. Especially for Praziquantel, decreased sensitivity has been reported. Therefore, targeted research and development of new drugs is essential.

In the GREVELDING lab, the schistosomal aldehyde-dehydrogenase was identified as a potential drug target. First experiments with Disulfiram, which is a known inhibitor of the human aldehyde-dehydrogenase and used for treatment of alcohol dependence, were performed. At a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , good antischistosomal activity, including morphological effects (i.e. tegumental disruption) was observed for disulfiram (dimer of diethyldithiocarbamate). At the same time, cytotoxic effects occurred at concentrations of 25  $\mu\text{M}$  leading to exclusion of disulfiram itself as drug candidate. Nevertheless, it was used as a starting point in the SCHLITZER lab (P. MÄDER) for structural modification. Thereby, the class of dithiocarbamates was chosen and further synthesis of several hundred compounds followed. The most active candidates were those with the N-atom of the dithiocarbamate substituted with a sulfonylpiperazine moiety (i.e. small alkyl and phenyl) and the single bonded S-atom carrying a *para*-nitrobenzyle substituent.

In this work, further development of the sulfonylpiperazine derivatives was performed, by substituting the phenyl-moiety with electron-withdrawing and with electron-donating groups, who possess distinct steric requirements, additionally to which structure-activity relationships were established. The phenyl-moiety was also replaced by several heteroaromatics or fused ring systems. Furthermore, the substitution of the alkyl-group with small polar groups and synthesis of cycloalkyl substituents was carried out. In addition to sulfonamide derivatives, synthesis of asymmetrical substituted sulfuric acid diamides was pursued, since introduction of an additional nitrogen atom should be accompanied by better water solubility. For this purpose, a synthesis route starting from *N,N'*-sulfurylbisimidazole was established, which was used for the

preparation of both tri- and tetra-substituted derivatives. As acylpiperazine derivatives showed good antischistosomal effects previously, piperazine-urea derivatives were considered as a secondary line for development in this work. To verify the necessity of the dithiocarbamate-skeleton, the heteroatoms therein were exchanged. Because of formation of highly reactive intermediates during biotransformation of the nitro-group, which in turn interact negatively with biomolecules, the nitro-group at the S-benzyl residue had to be placed by physiologically better tolerated residues. For this, several strategies were pursued: (1) monosubstitution with electron-withdrawing groups, (2) multisubstitution to produce a dipole moment comparable to that of the nitrophenyl substituent, (3) substitution with groups of similar geometry and ability to form comparable interactions, (4) substitution with groups of identical molecular shape and volume and approximately equal distribution of electrons, (5) substitution with  $\pi$ -electron-poor heteroaromatics. The best optimizations of all parts of the molecule were combined with each other, to check whether there is an additive relationship with respect to the antischistosomal activity when the optimized structural elements are combined.

Taken together, approximately 280 novel compounds were synthesized and tested *in vitro* against schistosome pairs of the species *S. mansoni*. While ninety compounds were initially active at 10  $\mu$ M, twenty-one compounds were still effective up to a concentration of 5  $\mu$ M, and ten of these even at concentrations < 5  $\mu$ M. Of a total of seventy-six derivatives for which cytotoxicity could be determined, thirty-three were non-cytotoxic at 100  $\mu$ M. The most effective compounds are thus roughly comparable with Praziquantel *in vitro* but show different phenotypes. To determine the spectrum of action of the dithiocarbamates, selected compounds were also tested against the juvenile stage of the parasite, other species such as *S. japonicum* and other helminths (*Fasciola hepatica* or *Echinococcus multilocularis*), and were particularly active. This was followed by further biological investigations (long-term tests, out-wash of inhibitors and confocal microscopic examinations of the internal schistosomal morphology). Finally, binding studies of dithiocarbamates using molecular docking on an established homology model of schistosomal aldehyde dehydrogenase and an *in-silico* based prediction of ADME-Tox parameters and a first up-scaling of the synthesis were performed.

## Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AR	Aldosereduktase
Ar	Aryl
AU	atomic unit
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
c	Konzentration
calc.	berechnet
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CC <sub>50</sub>	50%-ige zytotoxische Konzentration
clogP	berechneter Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
cm	Zentimeter
CYP	Cytochrom P450
$\delta$	chemische Verschiebung
d	Tag(e)
D	Debye
Da	Dalton
DBPO	Dibenzoylperoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Elementaranalytik
ED <sub>(50)</sub>	effektive Dosis, bei der bei 50% der Individuen die gewünschte Wirkung eintritt; auch mittlere effektive Konzentration EC <sub>50</sub>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDG	elektronenschiebende Gruppe
EI	Elektronenstoßionisation
eq	Äquivalente
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
EtOAc	Essigsäureethylester
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
eV	Elektronenvolt
EWG	elektronenziehende Gruppe
FDA	<i>food and drug administration</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
h(HDAC)	humane Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
$h \cdot \nu$	Strahlungsenergie mit $h$ = plancksches Wirkungsquantum und $\nu$ = Frequenz des eingestrahnten Lichts
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	<i>high resolution</i>
Hz	Hertz
+ / - I	induktiver Effekt

IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration, bei der die Hälfte der maximal möglichen Hemmung erreicht wird
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kat.	Katalysator
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert
LC	Flüssigchromatographie
LD <sub>5</sub>	Letaldosis, bei der 5% der Individuen sterben
LM	Lösungsmittel
+ /- M	mesomerer Effekt
M	Molar [mol/L]
M	Molare Masse [g/mol]
m	Meter
mbar	Millibar
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeOTf	Methyltriflat
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
Mio.	Millionen
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol
mmol	Millimol
MS	Masse
MsCl	Methansulfonylchlorid
MW	Mikrowelle oder Molekulargewicht
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
n	Anzahl durchgeführter Versuche oder Anzahl von Kettengliedern



NBS	N-Bromsuccinimid
NCS	<i>newborn calf serum</i>
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTD	<i>neglected tropical disease</i>
OXA	Oxamniquin
p. a.	<i>pro analysis</i>
Pd/(C)	Palladium auf Aktivkohle
PG	Schutzgruppe
Ph	Phenyl
pK <sub>s</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pm	Picometer
ppm	<i>parts per million</i>
Py	Pyridin
PZQ	Praziquantel
R	Organischer Rest
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
$\sigma$	<i>Hammett</i> -Parameter
s	Sekunde
SAR	<i>structure-activity relationship</i>
Schmpkt	Schmelzpunkt
Sm(HDAC)	schistosomale Histondeacetylase
spp.	<i>species pluralis</i>
SULT	Sulfotransferase
t	Zeit
TBA(I)	Tetrabutylammonium(iodid)
TBS(Cl)	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl(chlorid)
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
<i>t</i> -Butyl	<i>tert</i> -Butyl
TCT	2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin
TMS	Trimethylsilan
Temp	Temperatur

TFA	Trifluoressigsäure
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
ü. N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
VOCC	voltage-operated calcium channels
W	Watt
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WMS	<i>worm motility score</i>
µm	Mikrometer
µL	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

## **weitere Angaben**

---

Einzelne Aminosäuren wurden im Ein- bzw. Dreibuchstabencode aufgeführt.

Alle angegebenen clogP-Werte wurden mit der Software DataWarrior berechnet.<sup>[1]</sup>

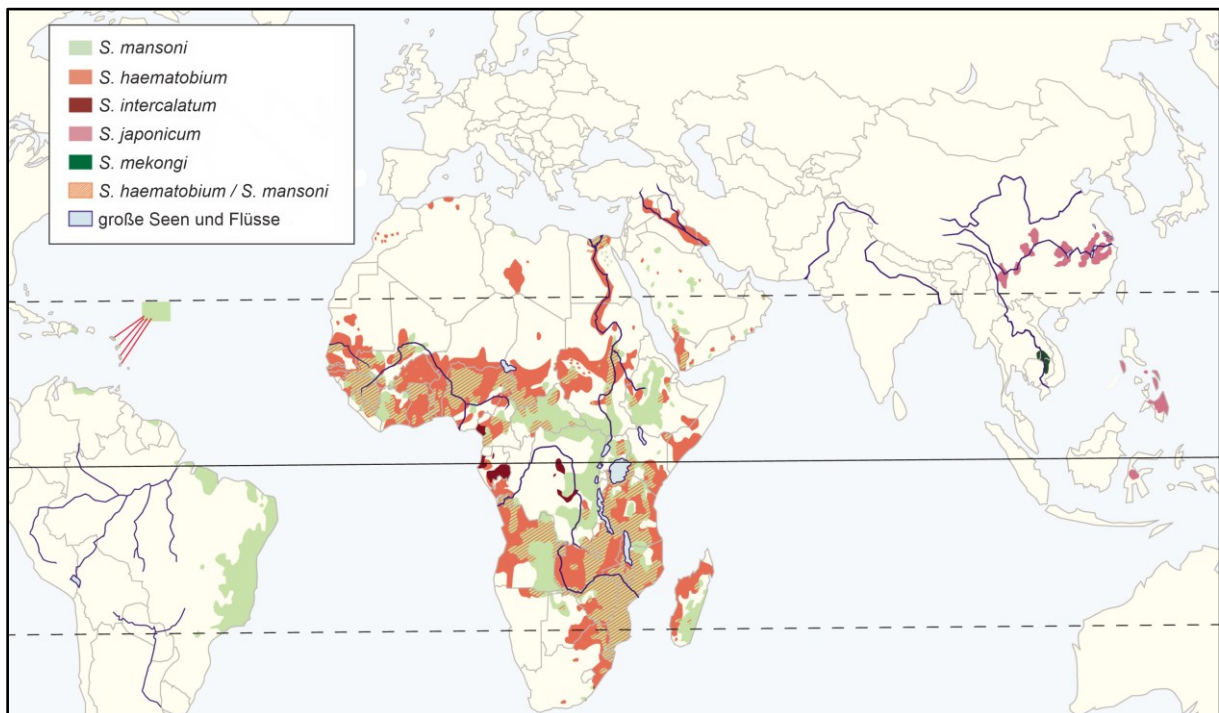
Angegebene pK<sub>s</sub>-Werte entstammen der Literatur.<sup>[2]</sup>

# 1 Einleitung

## 1.1 Schistosomiasis

### 1.1.1 Epidemiologie und Erreger

Weltweit sind etwa 1,6-2,3 Milliarden Menschen von vernachlässigten Tropenerkrankungen (*neglected tropical diseases*, NTDs) betroffen, viele Millionen sterben jährlich an den Folgen.<sup>[3,4]</sup> Die Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) zählt aktuell 20 Erkrankungen zu der Gruppe der NTDs, zu denen auch die Schistosomiasis (Bilharziose) gehört. Diese wird durch Trematoden (Saugwürmer) der Gattung *Schistosoma* spp. (Pärchenegel) ausgelöst. Endemisch ist die parasitäre Erkrankung in 78 Ländern: überwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten insbesondere des afrikanischen Kontinents, Südamerikas, des Nahen Ostens und Asiens (**Abb. 1**).<sup>[5]</sup> Zudem gibt es Berichte eines autochthonen Infektionsherdes in Südeuropa (Süd-Korsika).<sup>[6,7]</sup>



**Abbildung 1:** Globale Verbreitung der Schistosomiasis differenziert nach Art des humanpathogenen Erregers (modifiziert nach GRYSEELS *et al.*)<sup>[8]</sup>

Mehr als 700 Millionen Menschen leben in Hochrisikogebieten.<sup>[9]</sup> Im Jahr 2018 benötigten etwa 229-290,8 Millionen Menschen eine Behandlung gegen die Schistosomiasis.<sup>[5]</sup> Vor allem Schulkinder sind betroffen und werden stark in ihrer Entwicklung beeinträchtigt (60-80% gegenüber 20-40% der Erwachsenen).<sup>[10]</sup> Etwa 90% der Infizierten leben in Afrika. Nach Schätzungen sterben zwischen 24.000-200.000 Menschen pro Jahr an den Folgen einer Infektion.<sup>[5]</sup> Damit gehört die Schistosomiasis zu den fünf bedeutendsten Erkrankungen der NTDs.<sup>[11]</sup> Die WHO schätzt, dass sich die Summe aus den durch vorzeitigen Tod verlorenen

Lebensjahren und den mit der Krankheit bzw. Behinderung gelebten Lebensjahren (DAILY = *disability-adjusted life years*) auf 4,5 Mio. Jahre beläuft (Vergleich: 35,7 Mio. Jahre für Malaria als bedeutendste parasitäre Erkrankung hinsichtlich Mortalität und Morbidität; keine NTD).<sup>[12,13]</sup>

Neben hybriden Formen gibt es sechs humanpathogene Schistosomen-Spezies.<sup>[14-17]</sup> Die drei Hauptspezies, welche für die meisten Erkrankungen verantwortlich gemacht werden, sind *S. mansoni*, *S. haematobium* und *S. japonicum*.<sup>[13]</sup> Sie unterscheiden sich unter anderem durch a) ihre geographische Verbreitung, b) die als Zwischenwirt dienende Gattung der Süßwasserschnecke, c) die im Infizierten befallenen Organe und damit die klinische Erscheinung der Erkrankung, d) die Eimorphologie (**Tab. 1**).<sup>[18-20]</sup> Außer dem Menschen haben Schistosomen eine Vielzahl anderer Erregerreservoirs. So sind weitere Säugetiere wie beispielsweise Affen, Hunde, Nagetiere, Rinder, Schweine und Wasserbüffel von der Schistosomiasis betroffen, womit ein großes zoonotisches Potenzial der Schistosomen und damit die Übertragung von Mensch zu Tier und umgekehrt verbunden ist.<sup>[21-23]</sup>

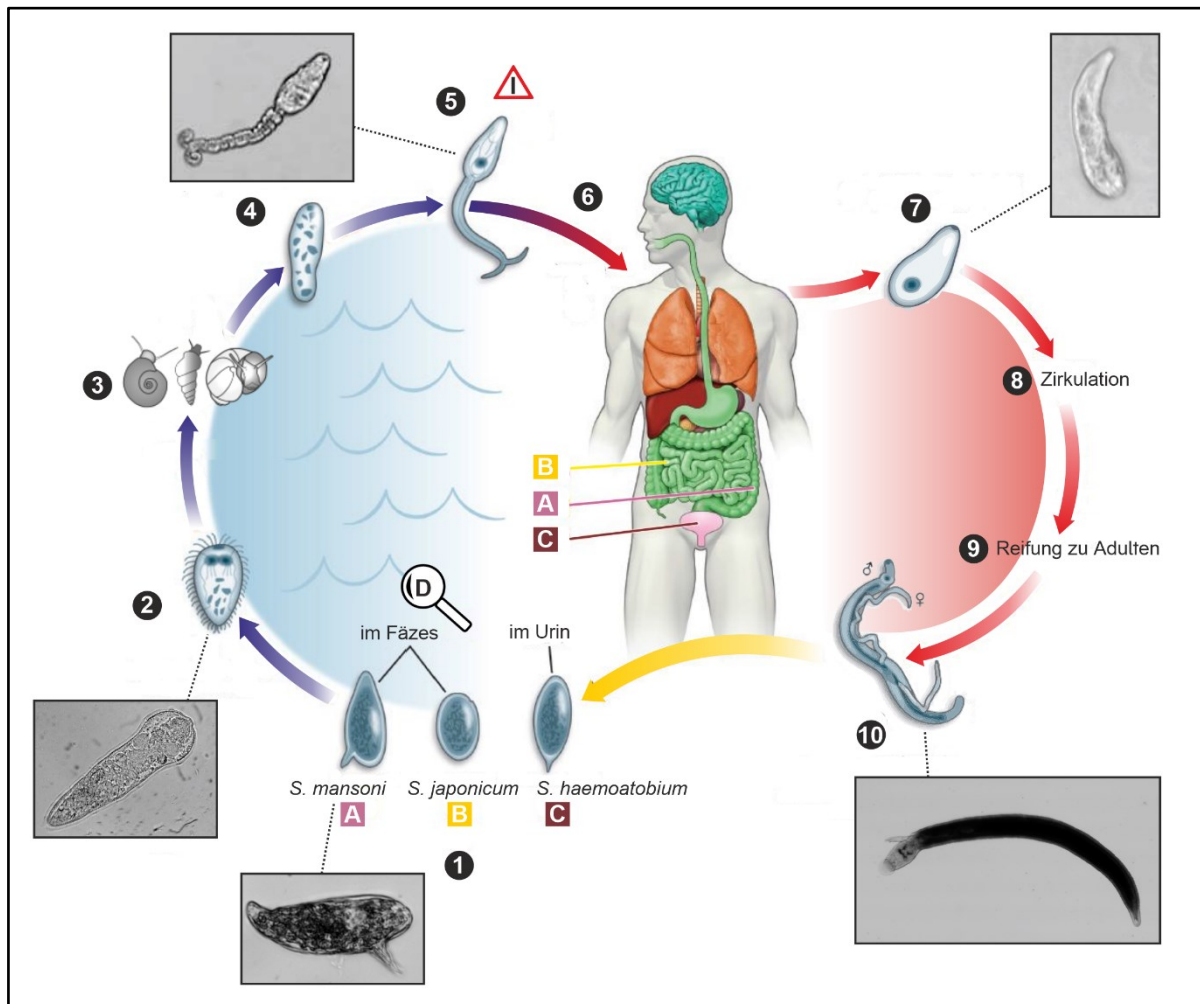
**Tabelle 1:** Unterschiede der humanpathogenen Schistosomen-Spezies (modifiziert nach ELBAZ *et al.*)<sup>[18,20]</sup>

Schistosomenart	Zwischenwirt	endemische Gebiete	Typ der Erkrankung
<i>S. guineensis</i>	<i>Bulinus forskalii</i>	West-Afrika	intestinal
<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus</i> spp.	Afrika, Mittlerer Osten, Süd-Korsika	urogenital, spinal
<i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus</i> spp.	Afrika	intestinal, urogenital
<i>S. japonicum</i>	<i>Oncomelania</i> spp.	China, Ostasien, Philippinen	intestinal, hepatolienal, intrazerebral
<i>S. mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i> spp.	Afrika, Südamerika, Karibik, Mittlerer Osten	intestinal, hepatolienal, kardiopulmonal, spinal
<i>S. mekongi</i>	<i>Neotricula aperta</i>	Südostasien	intestinal, hepatolienal

Der Erreger der Erkrankung wurde um 1850 von dem deutschen Tropenarzt THEODOR BILHARZ bei Obduktionen in einer Kairoer Klinik entdeckt und erstmals beschrieben.<sup>[24,25]</sup> Die Übertragungswege und die Zwischenwirt-Spezies waren jedoch lange unklar und wurden erst Anfang des 20. Jahrhunderts aufgeklärt.

Der Lebenszyklus wird in **Abbildung 2** veranschaulicht und nimmt seinen Anfang bei den mit menschlichen Exkreten eines befallenen Endwirts ins Wasser gelangten Schistosomen-Eiern (**Nr. 1**). Diese setzen etwa 135 µm große Wimpernlarven frei, die sogenannten Miracidien, die in freien Gewässern eine durchschnittliche Lebenserwartung von 10 Stunden haben (**Nr. 2**).<sup>[26,27]</sup> Die Larven befallen als Zwischenwirt verschiedene Arten von Süßwasserschnecken (**Nr. 3**). In den Schnecken vollzieht sich dann innerhalb von 4-6 Wochen zunächst die Transformation der Larven in Mutter-Sporocysten, die sich daraufhin asexuell vermehren und mehrere Generationen von Tochter-Sporocysten produzieren (**Nr. 4**). Diese wandern in die Verdauungsorgane der Schnecke, wo sie sich in weiteren asexuellen Reproduktionszyklen in Zerkarien umwandeln. Die Zerkarien verlassen schließlich ihren Zwischenwirt, wobei eine Schnecke tausende bis zehntausende von Zerkarien (etwa 1500 Zerkarien pro Tag) über mehrere Monate hinweg freisetzt (**Nr. 5**).<sup>[28]</sup> Die frei beweglichen, etwa 400-600 µm großen Zerkarien mit einer Lebenszeit von ca. 72 Stunden können im Weiteren nun Menschen oder andere höhere Wirbeltiere, die Hauptwirte der Saugwürmer, infizieren (**Nr. 6**).<sup>[26,29]</sup> Beim Menschen geschieht dies in der Regel bei alltäglichen Situationen wie beispielsweise dem Schwimmen, dem Waschen, der Fischerei oder der Landbewässerung. Die Infektion, für die weniger als eine Minute Kontakt ausreicht, erfolgt durch das Eindringen der Zerkarien in die Haut des Hauptwirtes.<sup>[30,31]</sup> Dabei verlieren die Zerkarien ihren Schwanz und wandeln sich in Metazerkarien (Schistosomula) um, eine juvenile Vorform (**Nr. 7**). Über die Kapillaren und das lymphatische Gewebe gelangen die Parasiten in den Blutstrom und wandern schließlich innerhalb der nächsten 2-3 Tage über das Herz in die Lunge und schließlich nach 3-4 Wochen in die Leber (**Nr. 8**).<sup>[32]</sup> Während dieser Zeit nimmt ihr Wachstum stark zu und sie reifen dabei zum Adultstadium (**Nr. 9**) heran (Maße eines ausgewachsenen Wurms vom Typ *Schistosoma* spp.: 10-20 mm lang; 0.3–0.6 mm breit).<sup>[26]</sup> Dabei bilden sie sowohl das männliche wie auch das weibliche Geschlecht aus, was eine Einzigartigkeit innerhalb der Gruppe der Trematoden darstellt.<sup>[33]</sup> Es folgt schließlich die Paarung der lebenden Parasiten: dabei bildet das kürzere, muskulösere Männchen den sogenannten gynäkophoren Kanal, in welchen das schlankere, längere Weibchen aufgenommen wird. Das Weibchen wird dabei vollkommen vom Männchen umschlossen (**Nr. 10**). Ein solcher Zustand kann ein ganzes Schistosomen-Leben lang aufrechterhalten bleiben.<sup>[34]</sup> Der Paarungskontakt ist essenziell für die Entwicklung der Reproduktionsorgane des Weibchens (insbesondere des Ovars und des Vitellariums) und führt zu deutlichen morphologischen und physiologischen Unterschieden zwischen maturen und immaturen, also paarungsunerfahrenen Weibchen, die noch keine Eier legen können.<sup>[35–38]</sup> Das Männchen migriert nun

speziesabhängig zu den Venen des mesenterialen Systems (**A**: insbesondere *S. japonicum* und **B**: *S. mansoni*) oder den Venen des Urogenitaltraktes (**C**: *S. haematobium*). Dort angekommen (etwa 40 Tage nach der Infektion), legt das Weibchen speziesabhängig kontinuierlich 200-2000 Eier pro Tag (Länge: 100-170 µm).<sup>[28,39]</sup> Von diesen gelangen anschließend etwa 50% in das Lumen von Darm oder Harnblase, wo sie schließlich mit dem Urin oder dem Kot ausgeschieden werden. Der Zyklus kann erneut durchlaufen werden.<sup>[26]</sup>



**Abbildung 2:** Schistosomen-Lebenszyklus:

**1:** Eier; **2:** Miracidium; **3:** Süßwasserschnecken als Zwischenwirte; **4:** Sporocyste; **5:** Zerkarie; **6:** Zerkarien dringen durch die Haut in den Endwirt ein; **7:** Schistosomulum; **8+9:** Körperzirkulation und Heranreifen zu Adulten; **10:** Paarung der Schistosomen und Abwanderung in die Zielgewebe; **A:** Dickdarm; **B:** Dünndarm; **C:** Harnblase; **I:** infektiöses Stadium; **D:** diagnostizierbares Stadium; mikroskopische Aufnahmen nicht maßstabsgetreu (modifiziert)<sup>[40]</sup>

Adulte Würmer haben eine durchschnittliche Lebenszeit von 3-10 Jahren, können in einigen Fällen aber auch bis zu 40 Jahre in ihrem Wirt überleben.<sup>[41,42]</sup> Sie ernähren sich dabei unter anderem von roten Blutkörperchen. Aus diesen gewinnen sie Hämoglobin, das dann in Aminosäuren gespalten wird, die der Parasit für den Proteinaufbau benötigt.<sup>[43]</sup> Die

Aminosäuren sind zudem für Wachstum, Entwicklung und Reproduktion des Parasiten essenziell.<sup>[44,45]</sup> Seine Energieversorgung ist an einen Glucose-Metabolismus gekoppelt, wohingegen die Eiproduktion der Oxidation von Fettsäuren bedarf.<sup>[46–48]</sup> Das theoretische Reproduktionspotenzial eines einzelnen Schistosomen-Paars, gemessen an der Gesamteizahl, beträgt bis zu mehreren Millionen Schistosomen.

Ließe sich die Verunreinigung des Wassers mit Urin und Fäkalien mitsamt den darin enthaltenen Schistosomen-Eiern verhindern, wäre die Transmission des Parasiten unterbrochen. Der Lebenszyklus des Parasiten käme zum Erliegen, wenn diese das Wasser nicht erreichen, austrocknen und somit für die Transmission keine Rolle mehr spielen würden. Aus diesem Grund stellen die Erziehung zur Vermeidung von Wasserverschmutzung und die gleichzeitige Bereitstellung von besseren sanitären Anlagen Schlüsselmaßnahmen zur Langzeiteindämmung der Krankheit dar.<sup>[49]</sup> Eine andere Strategie besteht in der Dezimierung der Schnecken mittels Molluskiziden. Diese Methode ist jedoch wegen der wiederholten Anwendung und der weit verstreut liegenden Wasserhabitate aufwendig und teuer. In den 1960er Jahren wurde zu diesem Zweck beispielsweise Niclosamid (**150; Abb. 28**) eingesetzt. Es ist jedoch unspezifisch, wirkt auch als Fischgift und hat somit gravierende Folgen für die Umwelt.<sup>[50–52]</sup>

### 1.1.2 Krankheitsverlauf

Abhängig von dem Stadium der Infektion zeigt sich eine große Bandbreite verschiedenartiger klinischer Symptome, die zum Teil unspezifisch und somit nur schwer von anderen Krankheiten zu unterscheiden sind.

Erste Symptome sind vorübergehende lokale Hautausschläge (erythematöse, papulöse Exantheme) und Juckreiz, zu denen es im Zuge der Hautpenetration der Zerkarien, der so genannten Zerkariendermatitis, kommen kann. Diese Hautreaktion tritt vor allem bei Patienten auf, bei denen es zu einer Reinfektion mit derselben Zerkarienart gekommen ist.<sup>[53]</sup> Etwa zwei bis zehn Wochen nach der Exposition kann dann eine akute Form der Schistosomiasis auftreten, das sogenannte *Katayama*-Fieber. Es stellt eine systemische Hypersensitivitätsreaktion auf die Schistosomen dar und geht einher mit einer drastischen Erhöhung der Zahl eosinophiler Granulozyten (Eosinophilie). Typische Anzeichen sind unter anderem trockener Husten, Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit und Muskelschmerzen (Myalgie). Diese Erscheinungen bestehen einige Tage, ehe ein spontanes Abklingen erfolgt. Dennoch sind auch schwerere Verläufe mit anhaltender und weiterer Symptomatik möglich.<sup>[54]</sup>

Die Schistosomiasis geht schließlich in eine chronische Phase über, die von der Parasitenspezies, der Stärke des Wurmbefalls und der Eiablage abhängt. Sie ist Ausdruck der

Immunreaktion des Wirts gegen die nicht ausgeschiedenen und im Körper verbliebenen Wurmeier.<sup>[10,26]</sup> Diese verbleiben nicht ausschließlich in der unmittelbaren Umgebung der adulten Würmer, also der Darm- und Blasenschleimhaut (intestinale bzw. urogenitale Schistosomiasis), sondern werden zudem mit dem Blutstrom in andere Organe verschleppt. So kommt es insbesondere zu einer Ablagerung in der Leber (hepatolienale Schistosomiasis) und gegebenenfalls in der Milz oder der Lunge bzw. des Herzens (kardiopulmonale Schistosomiasis).<sup>[20,55]</sup> Seltener sind das Zentralnervensystem (Neuroschistosomiasis) und andere Organe wie das Pankreas, die Haut oder die Schilddrüse (ektope Schistosomiasis) betroffen.<sup>[20,56–58]</sup> Die Eier sekretieren unter anderem proteolytische Enzyme, die das Gewebe reizen und Entzündungen hervorrufen.<sup>[59,60]</sup> Da das Immunsystem nicht in der Lage ist, die Eier zu eliminieren, kapselt es diese ein; es kommt zur Granulombildung (knötchenartige Gewebsneubildung) und zunächst zum Auftreten von Wucherungen und Geschwüren. Später tritt dann eine Fibrosierung (Vermehrung von Bindegewebe) verbunden mit einer Gewebsveränderung und somit dem Verlust von gesundem, funktionsfähigen Gewebe auf.<sup>[61–63]</sup>

Kennzeichen der urogenitalen Schistosomiasis sind Blut im Harn (Hämaturie) in Kombination mit einer Blasenentleerungsstörung (Miktionsbeschwerden) und Harnabflussstörungen bis hin zu Nierenversagen oder Entzündungen des Genitals.<sup>[64]</sup> Komplikationen bestehen zudem in der Ausbildung eines Plattenepithelkarzinoms der Harnblase, der Unfruchtbarkeit vor allem bei Frauen (Interfertilität) und einem in Folge genitaler Läsionen erhöhten HIV-Infektionsrisiko.<sup>[65–68]</sup> Charakteristisch für die intestinale Schistosomiasis sind Abdominalschmerzen, Diarrhö und frisches Blut im Stuhl (Hämatochezie).<sup>[69]</sup> Die hepatolienale Schistosomiasis ist die folgenschwerste und die am häufigsten zum Tode führende Form und äußert sich im Anfangsstadium durch Oberbauchschmerzen, welche von einem Anschwellen der Milz und der Leber (Hepatosplenomegalie) begleitet werden.<sup>[70]</sup> Die Größenzunahme der Leber kommt nach einiger Zeit zum Stillstand; durch den bindegewebigen Umbau (Leberzirrhose) beginnt diese dann meist zu schrumpfen, womit Funktionsstörungen verbunden sind.<sup>[71]</sup> Unter Umständen können sich Flüssigkeitsansammlungen in der Bauchhöhle (Aszites) ausbilden.<sup>[20]</sup> Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zudem zu einem Blutstau in der Pfortader und somit zur Bildung von Umgehungskreisläufen (portokavale Kollateralen). Dies hat eine Erhöhung des Blutdrucks (Hypertension) in den betroffenen Gefäßen zur Folge, zum Beispiel der Speiseröhre, die daraufhin zu schweren Blutungen (Ösophagusvarizenblutung) neigen.<sup>[72]</sup> Werden Eier in großer Zahl aus der portalen in die pulmonale Zirkulation übergeleitet, kommt es überdies durch massive und anhaltende



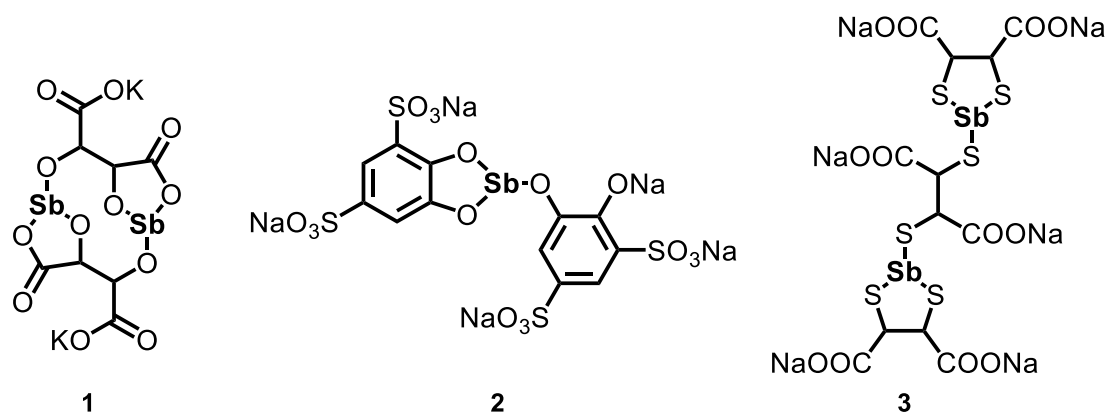
Embolien zu einer Behinderung des Lungenkreislaufs sowie bei zunehmender Belastung zu einer Rechtsherzbelastung und damit zu einer Herzinsuffizienz (kardiopulmonale Schistosomiasis).<sup>[73]</sup> Die häufigsten Symptome einer das Großhirn betreffenden (intrazerebralen) Schistosomiasis, die durch die raumfordernde Wirkung der Granulome hervorgerufen werden, sind epileptische Anfälle, motorisch-sensible Defizite und Sprachstörungen.<sup>[74,75]</sup> Demgegenüber steht die das Rückenmark betreffende (spinale) Schistosomiasis, die beispielsweise eine Rückenmarksentzündung (Myelitis) verursacht und auch zu unvollständigen Lähmungen einzelner Muskeln (Paresen) führen kann.<sup>[76–78]</sup>

Zur Diagnostik der Schistosomiasis wird in der Regel der mikroskopische Nachweis lebender Eier im Stuhl oder Urin herangezogen (Speziesdifferenzierung möglich).<sup>[79]</sup> Weiterhin ist der Nachweis parasitenspezifischer Antikörper oder der direkte Erregernachweis durch den Nachweis von Schistosomen-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion im Blut denkbar.<sup>[80,81]</sup>

### 1.1.3 Therapie der Schistosomiasis

#### 1.1.3.1 Aufgegebene Arzneistoffe

Die ersten Verbindungen, die gegen die Krankheit Schistosomiasis zum Einsatz kamen, waren antimonhaltige Arzneistoffe (**Abb. 3**). Sie wurden ab 1918 eingesetzt und waren ursprünglich zur Behandlung der Leishmaniose gedacht.<sup>[82]</sup> Antimontartrat (**1**) beispielsweise wirkt zwar gegen *S. mansoni* und *S. haematobium*, jedoch weniger stark gegen *S. japonicum*. Es wurde intravenös mehrmals am Tag über einen Zeitraum von etwa einen Monat verabreicht. Als nachteilig erwies sich vor allem seine hohe Toxizität, die sich durch seine langsame Elimination und damit zunehmende Akkumulation stetig verstärkte. Schwerwiegende Nebenwirkungen insbesondere auf den Magen-Darm-Trakt, das Herz- und Gefäßsystem sowie die Leber waren die Folge.<sup>[83]</sup> Auf der Suche nach besser wirksamen und gleichzeitig verträglicheren Antimonverbindungen entstanden eine Vielzahl von Substanzen, von denen einige auch klinische Anwendung fanden.<sup>[84]</sup> Bekannte Vertreter sind Stibophen (**2**), Anthiomalin, Triostam, Astiban (**3**) und Solustin.<sup>[85–89]</sup> Es stellte sich heraus, dass nur Moleküle mit dreiwertigem Antimon und Sauerstoffliganden maximale Wirkung zeigten, wohingegen Verbindungen mit Schwefelliganden besser verträglich waren. Aufgrund der schweren Nebenwirkungen wurde diese Gruppe von Arzneistoffen ab den 1970er Jahren nicht mehr verwendet. Gemeinsamer Wirkmechanismus aller Antimonderivate ist die Hemmung der Phosphofructokinase; diese enthält eine Thiolgruppe im aktiven Zentrum und nimmt eine wichtige Rolle bei der Glycolyse und damit der Energiegewinnung des Parasiten ein.<sup>[90,91]</sup>

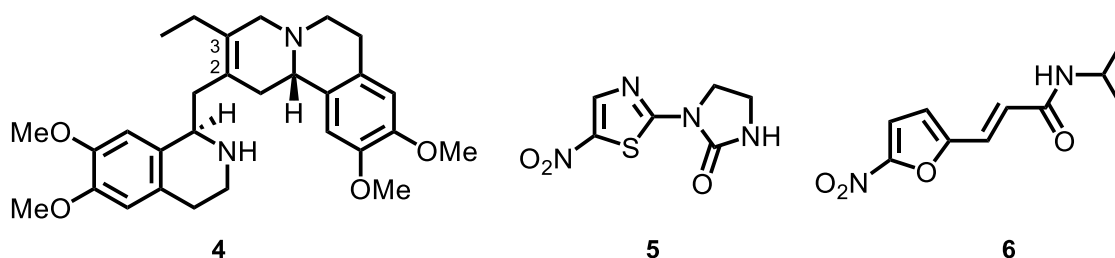


**Abbildung 3:** Strukturformel von Antimontartrat (1), Stibophen (2) und Astiban (3)

Ab 1920 wurde das ursprünglich zur Behandlung der Amöbenruhr verwendete Alkaloid Emetin gegen *S. japonicum* eingesetzt.<sup>[83,92,93]</sup> Es besitzt einen geringen therapeutischen Index (LD<sub>5</sub>/ED<sub>95</sub>) und wurde somit zunächst durch das Strukturanalogen 2,3-Dehydroemetin (4) ersetzt, das bei gleicher Aktivität eine um die Hälfte verringerte Toxizität zeigt.<sup>[94–97]</sup> Da für eine erfolgreiche Behandlung jedoch wiederholte Injektionen von Nöten waren, wurde der Arzneistoff letztlich abgesetzt.<sup>[98]</sup> Seine Wirkung beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese.<sup>[99]</sup>

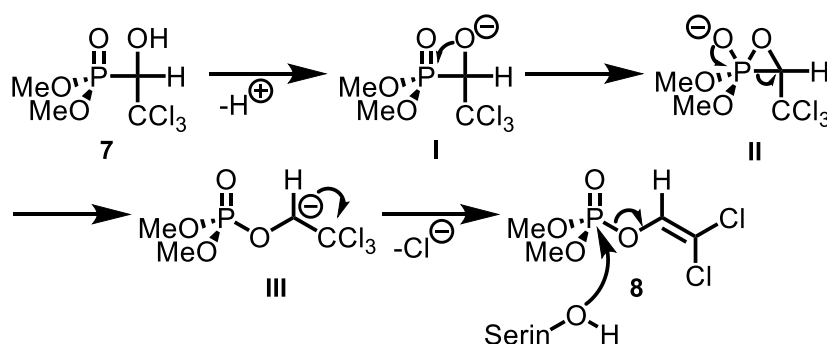
In den 1960er Jahren wurde das Nitrothiazol-Derivat Niridazol (5) entwickelt.<sup>[100,101]</sup> Es ist einer Reihe von Hydantoin-Derivaten zuzuordnen, von denen das Phenytoin als erster interessanter Vertreter hinsichtlich der Bekämpfung der Schistosomiasis zu nennen ist.<sup>[102]</sup> Niridazol (5) erweist sich als effektiv gegenüber *S. haematobium* mit Heilungsraten von mehr als 90% und deutlich verringerten Eiproduktionen nicht Parasiten-freier Patienten.<sup>[103,104]</sup> Mit *S. mansoni* infizierte Patienten zeigten nach siebentägiger oraler Gabe des Medikaments eine Heilungsrate von 70-100%.<sup>[104,105]</sup> Nachteilig waren aber die schweren Nebenwirkungen auf das Zentralnervensystem, von denen 3% der erwachsenen Patienten betroffen waren.<sup>[106]</sup> So musste die Therapie bei etwa 40% der von einer Schistosomiasis Betroffenen abgebrochen werden.<sup>[107]</sup> Weiterhin sind immunsuppressive und karzinogene Wirkungen bekannt.<sup>[104,108]</sup> Niridazol (5) wird durch Reduktion seiner Nitrogruppe in adulten Schistosomen in seine Wirkform überführt, die daraufhin kovalent unter anderem an Thiolgruppen von Proteinen bindet.<sup>[83,109]</sup>

Auch der Einsatz von Nitrofuranen wie Furapromidium (6) war um 1960 in China insbesondere gegen *S. japonicum* weit verbreitet.<sup>[83,110]</sup> Diese für ihre antibakterielle Wirkung bekannte Substanzklasse verlor jedoch aufgrund der Toxizität und suboptimalen Aktivität der Verbindungen alsbald an Bedeutung.



**Abbildung 4:** Strukturformel von 2,3-Dehydremetin (**4**) und Niridazol (**5**) und Furapromidium (**6**)

Die zunächst als Insektizid eingesetzte Organophosphorverbindung Metrifonat (**7**) wurde ab den 1960er Jahren in die Therapie der Schistosomiasis eingeführt.<sup>[111–113]</sup> Metrifonat (**7**) ist wirksam gegen *S. haematobium* (Senkung der Parasitenlast um 50-60%; Verringerung der Eiproduktion um 90-95 %), besitzt eine geringe Toxizität und wurde von der WHO bis ins Jahr 2000 zur Behandlung der urogenitalen Schistosomiasis empfohlen.<sup>[83,114–117]</sup> Das unter wässrigen Bedingungen instabile Metrifonat zerfällt zu Dichlorovos (**8**), einem irreversiblen Cholinesterase-Hemmer, dessen Einsatz auch bei Alzheimer-Patienten untersucht wurde.<sup>[118–121]</sup> Die Dichlorvinylgruppe stellt eine gute Abgangsgruppe dar, die durch die Hydroxylgruppe eines Serinrestes im aktiven Zentrum des Enzyms in einer Substitutionsreaktion irreversibel ausgetauscht werden kann (**Schema 1**).<sup>[122]</sup> Die Ansammlung von Acetylcholin vor allem im Tegument des Parasiten führt dann zu einer reversiblen Paralyse, in deren Verlauf sich der Wurm von den Gefäßwänden löst und mit dem Blutstrom in die Leber oder die Lunge gelangt.<sup>[123]</sup> Da Organophosphate unspezifische Acetylcholinesterase-Hemmer sind, können jedoch auch andere Esterasen gehemmt werden, womit gleichwohl eine Wirkung verbunden wäre. Aus diesem Grund ist der Wirkmechanismus nicht unumstritten.<sup>[124]</sup>



**Schema 1:**  $\alpha$ -Hydroxyphosphonat-Phosphat-Umlagerung zur Bildung von Dichlorovos (**8**) und Phosphorsäure-esterbildung als möglicher Wirkmechanismus von Metrifonat (**7**)<sup>[119,122]</sup>

1976 wurde die antischistosome Aktivität *in vitro* und *in vivo* von Amoscanat (**9**) gegen *S. japonicum*, *S. haematobium* und *S. mansoni* erstmals beschrieben.<sup>[125–129]</sup> Heilungsraten lagen bei über 90%.<sup>[83,130]</sup> Die Wirkung ist möglicherweise in Teilen auch auf die Isothiocyanat-Gruppe zurückzuführen, durch die Aminogruppen von Plasmaproteinen der Schistosomen thiocarbamoyliert werden.<sup>[83,131]</sup> Dies erklärt auch deren überaus starke Plasmaproteinbindung

von bis zu 80%. Wird die Isothiocyanat-Gruppe durch ein Methylpiperazin (**10**) oder Thionocarbamat (**11**) ausgetauscht, so bleibt die Wirkung jedoch erhalten. Aufgrund der starken Lebertoxizität wurde eine Weiterentwicklung von Amoscanat und seinen Derivaten nicht verfolgt.<sup>[132]</sup>

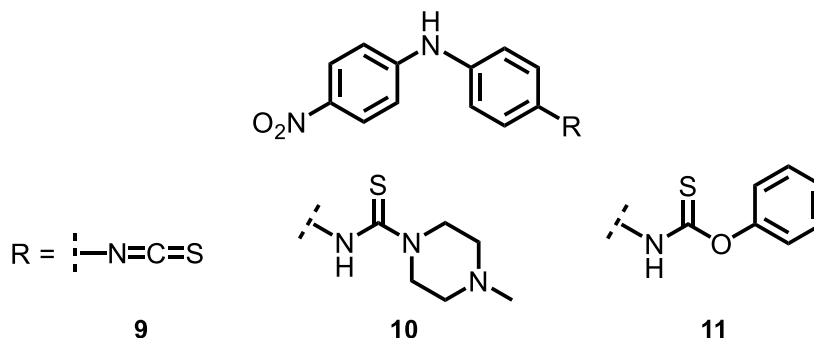


Abbildung 5: Strukturformeln von Amoscanat (**9**), CGP-6140 (**10**) und Phenithionat (**11**)

### 1.1.3.2 Arzneistoffe in der klinischen Anwendung

Laut WHO ist Oxamniquin (OXA; **17**) das bevorzugte Alternativmittel, wenn eine Therapie der Schistosomiasis mit Praziquantel scheitert.<sup>[133]</sup> Es wirkt jedoch ausschließlich gegen *S. mansoni*, wobei die Männchen im Vergleich zu den Weibchen stärker von der Wirkung betroffen sind.<sup>[134]</sup> Mit therapeutischen Dosen, die sich je nach geographischer Lage und damit dem Ursprung des Parasiten unterscheiden und zwischen 15-60 mg/kg Körpergewicht liegen, lassen sich Heilungsraten von 80-90% erzielen.<sup>[135,136]</sup>

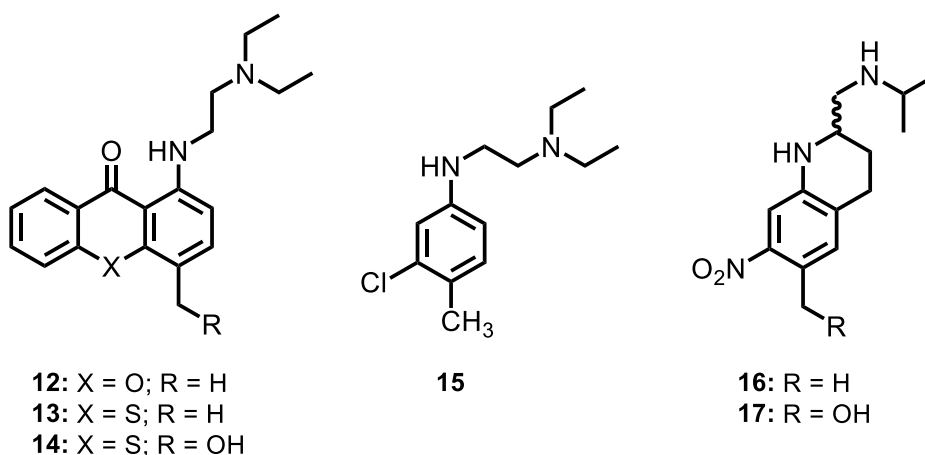
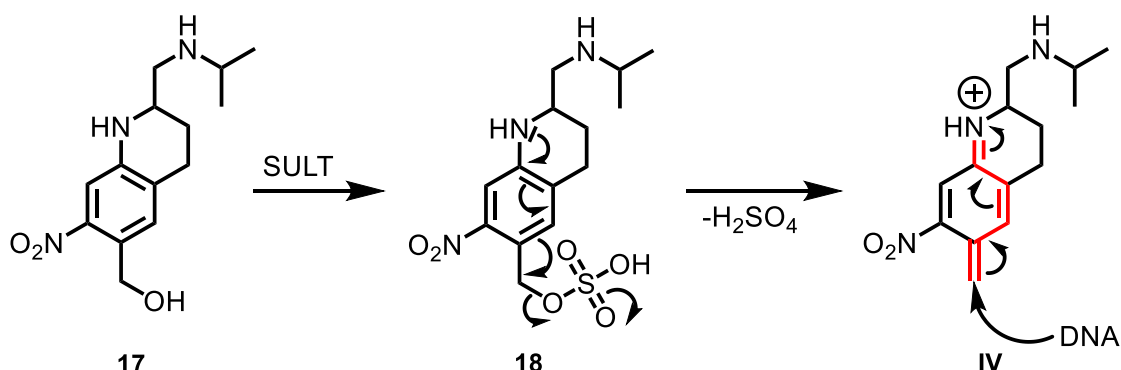


Abbildung 6: Strukturformeln von Miracil A (**12**), Lucanthion (**13**), Hycanthon (**14**), Mirasan (**15**), UK-3883 (**16**) und Oxamniquin (**17**)

Entstanden ist der Arzneistoff ausgehend von Lucanthion (Miracil D; **13**), dem Thioxanthen-Analogon von Miracil A (**12**). Dieses wurde 1938 im Zuge eines systematischen Schistosomizidprogramms von BAYER entdeckt, wirkte interessanter Weise aber nur oral.<sup>[137]</sup> Sein Oxidationsprodukt, das Hycanthon (**14**), war indessen auch *in vitro* aktiv, allerdings mutagen, teratogen und karzinogen.<sup>[138–142]</sup> Die weitere Entwicklung führte zu einer Reihe von

einfachen *N*-Alkyl-*p*-methylanilin-Derivaten und schließlich zu Mirasan (**15**), das in Mäusen, jedoch nicht im Affen und dem Menschen wirkte.<sup>[143]</sup> PFIZER entwickelte hieraus schließlich UK-3883 (**16**), dessen *in vitro* und *in vivo* aktiver Metabolit Oxamniquin (**17**) ist.<sup>[83,144]</sup>

OXA wirkt vermutlich als *Prodrug* und wird ausschließlich durch den Parasiten aktiviert. Hierzu wird es zunächst durch eine endogene Sulfotransferase (SULT) mittels 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als aktivem Substrat sulfatiert.<sup>[145,146]</sup> Strukturelle Unterschiede der Sulfotransferasen von *S. mansoni*, *S. haematobium* und *S. japonicum* erklären somit die Spezies-spezifische Aktivität.<sup>[147,148]</sup> Elimination von Hydrogensulfat bildet das reaktive und zugleich elektrophile Intermediat, das als Alkylans mit der DNA, Proteinen oder anderen nucleophilen Makromolekülen interagiert und so den Tod des Parasiten durch die Zerstörung zellulärer metabolischer Funktionen bewirkt (**Schema 2**). Alternativ reagiert der Schwefelsäuremonoester direkt mit zellulären Nucleophilen in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion.<sup>[149]</sup>



**Schema 2:** Wirkmechanismus von OXA (**17**) durch Sulfatierung und DNA-Alkylierung<sup>[149]</sup>

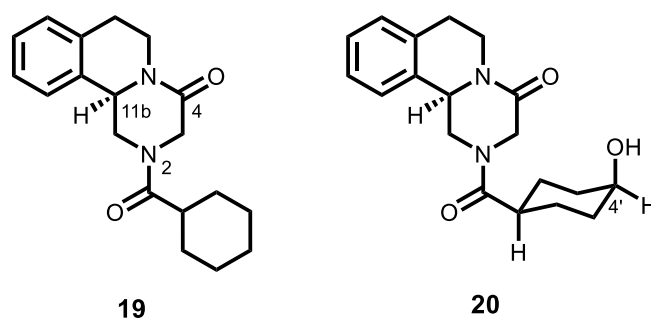
OXA wird als Racemat eingesetzt, wobei die Sulfotransferase von *S. mansoni* aus sterischen Gründen bevorzugt das *S*-Enantiomer bindet.<sup>[150]</sup> Resistenzen gegenüber OXA lassen sich auf die Abwesenheit des aktivierenden Enzyms (SULT) zurückführen.<sup>[151]</sup>

Seit seiner Einführung in den 1980er Jahren ist Praziquantel (PZQ; **19**) das Mittel der Wahl in der Therapie der Schistosomiasis. Es wurde von der MERCK KGaA zunächst als potentieller Tranquilizer entwickelt, ehe in den frühen 1970er Jahren dessen anthelmintisches Potential von der BAYER AG entdeckt wurde.<sup>[152–155]</sup> Nach einmaliger peroraler Gabe von 40-60 mg/kg Körpergewicht ist PZQ gegen alle humanpathogenen Arten aktiv und es lassen sich je nach Schistosomenspezies Heilungsraten von 63-89% erzielen.<sup>[156]</sup> Die Wirksamkeit von PZQ hängt dabei stark vom Fortschreiten der Infektion, dem Alter und Geschlecht des Wurms sowie dem Paarungszustand des Parasiten ab. Während frühe Wurmstadien empfindlich gegenüber PZQ sind, nimmt die Empfindlichkeit des Wurms nach der Infektion rapide ab und erreicht sehr niedrige Werte nach 3-4 Wochen. Danach steigt die Effektivität des Medikaments wieder auf

das Ausgangsniveau an, welches nach 6-7 Wochen erreicht wird.<sup>[157–159]</sup> Ferner ist der Einsatz von PZQ in der Veterinärmedizin erprobt und zugelassen.<sup>[160]</sup> Somit lassen sich Übertragungswege des Parasiten über Viehbestände unterbrechen. Außerdem weist PZQ ein breites anthelmintisches Wirkungsspektrum auf und ist gegen weitere Arten von Saugwürmern (Trematoden) und verschiedene Bandwurmart (Cestoden) aktiv.<sup>[160–163]</sup> Im Gegensatz zu anderen antischistosomal Wirkstoffen besitzt PZQ keine mutagenen, teratogenen oder karzinogenen Eigenschaften und nur eine geringe akute Toxizität.<sup>[164–168]</sup> Zudem verursacht es überwiegend nur geringe Nebenwirkungen.<sup>[169,170]</sup>

Für die anthelmintische Aktivität des PZQ sind als strukturelle Merkmale das Vorliegen eines Pyrazinoisochinolin-Derivates sowie die 4-Oxo- und die 2-Acyelfunktion von essenzieller Bedeutung. Eingeschränkte Aktivität zeigen auch die entsprechenden Thioanaloga. Maximale Aktivität wird darüber hinaus mit einem Cyclohexylcarbonyl-Rest in 2-Position erreicht. Daneben werden auch ein Benzoyl- oder ein 4-Aminobenzoylrest toleriert. PZQ besitzt ein Stereozentrum in Position 11b und wird racemisch eingesetzt. Dennoch ist nur das (R)-Enantiomer für die antischistosomale Aktivität verantwortlich.<sup>[160,171]</sup>

PZQ unterliegt einem ausgeprägten *first-pass*-Effekt. Dabei werden in der Leber hauptsächlich hydroxylierte Metaboliten gebildet, darunter der Hauptmetabolit **20** mit *trans*-Hydroxyfunktion in 4'-Position, der vermutlich einen großen Anteil an der antischistosomal Wirkung von PZQ hat.<sup>[83]</sup> Bei vergleichbarer Aktivität verfügt (R)-*trans*-4'-OH-PZQ über eine 18-33 mal höhere Plasma-Halbwertszeit.<sup>[172,173]</sup>



**Abbildung 7:** Strukturformeln von R-Praziquantel (**19**) und dem Hauptmetaboliten R-*trans*-4'-Hydroxy-Praziquantel (**20**)

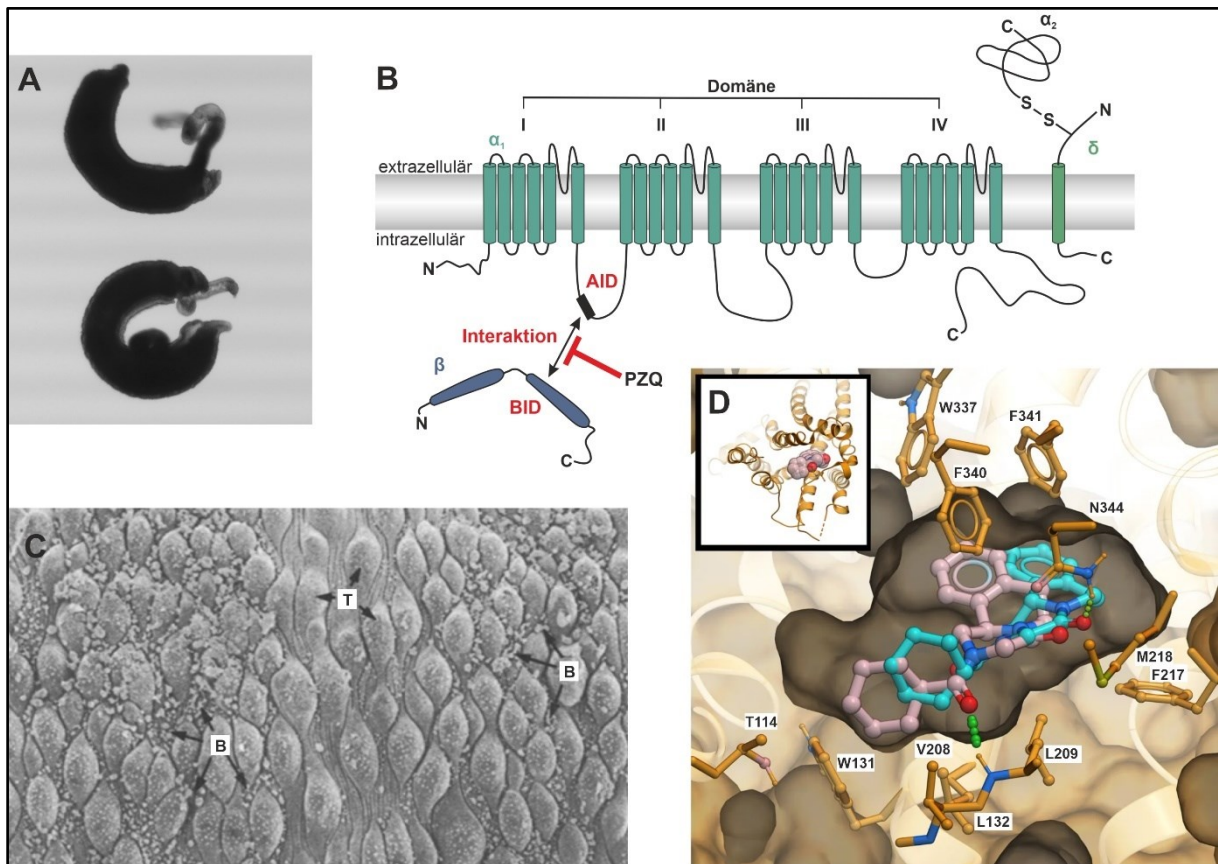
Der genaue Wirkmechanismus von PZQ ist Gegenstand vieler Diskussionen und nur teilweise bekannt. *In-vivo*-Studien zeigten, dass es wenige Sekunden nach dem Kontakt des Parasiten mit PZQ zu einer tetanischen Muskelkontraktion kommt, infolgedessen sich der Wurm von den Gefäßwänden löst und mit dem Blutstrom in die Leber gelangt.<sup>[174,175]</sup> Da die Paralyse (**Abb. 8A**) jedoch reversibel ist, können betroffene Würmer sich auch wieder erholen und zurück in die Mesenterialgefäße wandern.<sup>[176]</sup>

Die Muskelkontraktion ist die direkte Folge einer Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, was sich durch das Ausbleiben der Kontraktion in einem Calcium-freien Medium veranschaulichen lässt.<sup>[176–178]</sup> Unter dem Einfluss von PZQ verändern sich Membran-Lipiddoppelschicht und Membranfluidität, womit auch eine Änderung der Membranpermeabilität, der Rezeptoren und Kanäle verbunden ist.<sup>[179,180]</sup> Insbesondere spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VOCC), die eine zentrale Rolle bei der Regulation von intra-zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen einnehmen und damit neben der Kontraktion auch essenziell für die Genexpression und Freisetzung von Neurotransmittern sind, werden in diesem Zusammenhang oft genannt.<sup>[181]</sup> VOCCs sind heteromultimere Membranproteine, die aus einer porenbildenden  $\alpha 1$ -Untereinheit und drei kleineren auxiliären Proteinen bestehen: einer  $\alpha 2/\delta$ -, einer  $\gamma$ - und einer im Vergleich zu der des Menschen leicht veränderten  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha 1$ -Untereinheit umfasst vier verknüpfte, homologe Domänen mit jeweils sechs transmembranen Segmenten.<sup>[182]</sup> Es wird angenommen, dass PZQ eine Unterbrechung der Wechselwirkung zwischen der  $\beta$ - und der  $\alpha 1$ -Untereinheit induziert, die über die  $\beta$ -Interaktionsdomäne (BID) vermittelt wird; dadurch öffnen sich mehr Kanäle (**Abb. 8B**).<sup>[183–187]</sup> Von der letztlich veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration sind wiederum andere  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine betroffen. Hierzu zählt beispielsweise die  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase des sarco-/endoplasmatischen Retikulums (SERCA).<sup>[188]</sup> Auch Actin-/Myosin-Wechselwirkungen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesteuert.<sup>[189,190]</sup> Neuere Berichte deuten darauf hin, dass PZQ TRPM2-Kanäle (*transient receptor potential channel* der Melastin-Unterfamilie) aktiviert. Diese Ionenkanäle sind ebenso für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel.<sup>[191]</sup> Die Tatsache, dass die Wirkung von PZQ mit einer Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration einhergeht, zeigt auch ein Experiment, in welchem 50% von *S. mansoni*-Würmern eine normalerweise letale Konzentration an PZQ nach gleichzeitiger Behandlung mit den Calcium-Ionen-Kanalblockern Nicarpidin und Nifedipin überlebten.<sup>[192]</sup>

Weiterhin lassen sich vor allem im Bereich des Teguments morphologische Veränderungen beobachten (**Abb. 8C**). Dieses bläht sich auf und vakuolisiert zunehmend.<sup>[193,194]</sup> Verglichen mit dem Effekt der Muskelkontraktion sind hierfür aber weit höhere Konzentrationen erforderlich. Von der Schädigung ist neben dem Tegument in erheblichem Maße auch die darunter liegende Muskulatur betroffen. Ferner wird von einer Störung des Redoxzustands des Parasiten berichtet, die eine erhöhte Produktion von Superoxid-Anionen zur Folge hat.<sup>[195]</sup>

Ein wichtiger Aspekt der Wirksamkeit von PZQ scheint zudem in einem Synergismus aus Wirkstoff und der Immun-Antwort des Wirts zu liegen. So nimmt bei PZQ behandelten Schistosomen zuerst die Antigenpräsentation auf dem Tegument zu, was das Erkennen durch das Immunsystem erleichtert und somit eine effektive Abwehr ermöglicht.<sup>[196,197]</sup> Ein Versuch

mit T-Zellen-freien Mäusen, die mit *S. mansoni* infiziert wurden und somit weniger anfällig für PZQ waren, unterstreicht jenen Sachverhalt.<sup>[198]</sup>



**Abbildung 8:** Wirkungsmechanismen von Praziquantel

**A:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines paralysierten, ödematös aufgequollenen *S. mansoni*-Paares nach Inkubation von 5  $\mu\text{M}$  PZQ über 24 h (5-fache Vergrößerung). **B:** Molekulare Struktur eines spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanals. Vereinfacht dargestellt ist der Aufbau der ionenleitenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und ihrer assoziierten Proteine, der  $\beta$ - und der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit.  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Protein interagieren über die konservierten Bindungsdomänen AID ( $\alpha_1$ -Interaktionsdomäne in der ersten zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II) und BID ( $\beta$ -Interaktionsdomäne in der zweiten konservierten Domäne der  $\beta$ -Untereinheiten) miteinander. Jene Interaktion dient als Angriffspunkt von PZQ (modifiziert nach HOHAUS).<sup>[199]</sup> **C:** 300-fach vergrößerte rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Teguments eines männlichen *S. mansoni*-Wurms nach 60 min Inkubation mit 320  $\mu\text{M}$  PZQ. Zu sehen sind die Tegumentoberfläche, die mit Tuberkeln (T) besetzt ist. Manche Bereiche zeigen blasenartige Strukturen (B).<sup>[193]</sup> **D:** Docking-Pose von R- (rosa) und S-PZQ (türkis) im humanen  $5\text{HT}_{2B}$ -Rezeptor (Protein Databank Code: 5TVN). Beide Isomere von PZQ binden bevorzugt in der orthosterischen Bindungstasche. Das R-Isomer besitzt eine besser vorhergesagte Bindung, welche zum Teil auf eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat (NH-Gruppe von L209) zurückzuführen ist.<sup>[200]</sup>

Neben den direkten Auswirkungen, die PZQ auf den Parasiten hat, treten auch einige zeitverzögerte Sekundäreffekte auf. Unter anderem sind eine veränderte Glucoseaufnahme, Lactatexkretion sowie ein verringerter Glykogenhaushalt und eine veränderte Cholinesterase-Aktivität zu nennen.<sup>[201,202]</sup> Auch nimmt die Konzentration bestimmter Enzyme ab. Hierzu



zählen etwa die ATPase oder die alkalische Phosphatase.<sup>[83]</sup> Gleichwohl wird die Aufnahme von Adenosin und Uridin gehemmt <sup>[203]</sup>

(R)-PZQ ist außerdem ein partieller Agonist des humanen serotonergen G-Protein-gekoppelten Rezeptors (5HT<sub>2B</sub>; **Abb. 8D**).<sup>[200]</sup> Es ist bekannt, dass serotonerge Liganden regulatorisch auf den Gefäßtonus von Arterien und Venen einschließlich der Mesenterialgefäße wirken, womit eine veränderte Organdurchblutung einhergeht.<sup>[204,205]</sup> Diese erleichtert es, durch PZQ paralyisierte Würmer mit dem Blut in die Leber zu befördern, wo ihre Elimination erfolgt. So ruft PZQ nicht nur Veränderungen im Parasiten, sondern auch im Wirt hervor. Dies erklärt seine Effektivität in der klinischen Anwendung.

Da PZQ bereits seit Jahrzehnten sehr breit eingesetzt wird, ist die Sorge groß, dass sich Resistenzen bilden könnten. Erste Anzeichen, die auf eine Resistenzentwicklung hindeuten, finden sich *in vitro*, wo unter Laborbedingungen Resistenzen gegen *S. mansoni* und *S. japonicum* in Mäusen nach mehreren Zyklen der Behandlung mit steigenden PZQ-Dosen ausgelöst werden konnten.<sup>[206–209]</sup> Auch gibt es beispielsweise Berichte aus dem Jahr 1991 von *in vivo* verminderter Wirkung von PZQ. Im Senegal wurden demnach von 422 mit PZQ-behandelten Patienten, die an der intestinalen Schistosomiasis erkrankt waren, lediglich 18% mit therapeutischen Dosen erfolgreich geheilt. Auch die Erhöhung der Dosis brachte keinen nennenswerten Erfolg.<sup>[210–212]</sup> In einem Fall aus dem Jahr 1994 in Ägypten wird berichtet, dass man bei 2,4% von 1607 Patienten in deren Ausscheidungen weiterhin Eier der Parasiten fand. Die Patienten waren mit *S. mansoni* infiziert und hatten 2 Dosen von 40 mg/kg und eine Dosis von 60 mg/kg PZQ erhalten. Mit den Miracidien, die aus diesen Eiern schlüpften, wurden nach Transformation zu Zerkarien im weiteren Verlauf dann Mäuse infiziert. Die daraufhin erhaltenen Würmer zeigten 3-5 mal höhere ED<sub>50</sub>-Werte für PZQ. Verglichen mit anderen Resistenzen, bei denen die Werte auf ein Tausendfaches ansteigen können, ist dies sehr gering.<sup>[213,214]</sup> Es gibt jedoch weitere Fälle von Therapieversagen.<sup>[215–222]</sup> Dies ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass Patienten in Gegenden mit hoher Prävalenz unreife Würmer in sich tragen, die eine geringe Anfälligkeit gegenüber PZQ besitzen. Ebenso können Neuinfektionen Gründe für eine schlechtere Heilungsrate sein. Dies gilt auch für schon vorhandene Infektionen, die eine gewisse Prävalenzzeit besitzen.<sup>[223,224]</sup> Die verminderten PZQ-Sensitivitäten, die bisher nur auf kleine Patientenkollektive begrenzt sind, stellen keinen ausreichenden Beweis für eine umfassende Resistenz des Parasiten dar. Dennoch könnten Bestrebungen der WHO, die Therapie mit PZQ signifikant auszuweiten, zu einem erhöhten Selektionsdruck auf die Parasiten und letztlich zu einem vermehrten Auftreten von Resistenzen führen. Dieser Umstand sowie die Tatsache des Vorliegens von nur einem

Wirkstoff lassen eine Intensivierung der Forschungsaktivitäten an weiteren Therapieoptionen der Schistosomiasis zwingend geboten erscheinen.<sup>[225]</sup>

### 1.1.3.3 Malariatherapeutika als Ergänzung zu Praziquantel

Die Tatsache, dass sich sowohl Parasiten der Gattung *Plasmodium* spp. als auch der Gattung *Schistosoma* spp. im Wesentlichen vom Hämoglobin ihres Wirts ernähren und über einen ähnlichen Hämoglobinmetabolismus verfügen, war der Grund, gegen Malaria gerichtete Wirkstoffe auch auf eine mögliche antischistosome Wirkung zu testen.<sup>[226,227]</sup> Zu diesen zählen Artemisinin (ART; **24**) und dessen halbsynthetische Derivate. Bei mit *S. japonicum*- und *S. mansoni*-infizierten Mäusen zeigte Artemether (ARMT; **21**) vielversprechende Wirkung, wobei adulte Schistosomen weniger empfindlich als Schistosomula waren. Die Wurmlast konnte so kurz nach der Infektion im Falle von *S. japonicum* um 74-92% (nach 1-2 tägiger oraler oder intramuskulärer Gabe von 100-200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> und damit ca. 100-facher Dosis zur Therapie der Malaria) und im Falle von *S. mansoni* um 83-98% (nach sechstägiger Gabe von 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) reduziert werden. Nach längerer Infektionszeit hingegen sank der Wurmrückgang dann auf 47–70% beziehungsweise 39%.<sup>[228,229]</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden gegenüber *S. haematobium* erzielt.<sup>[230]</sup> Artesunat (ARTS; **22**) war gegenüber ARMT weniger aktiv.<sup>[231]</sup>

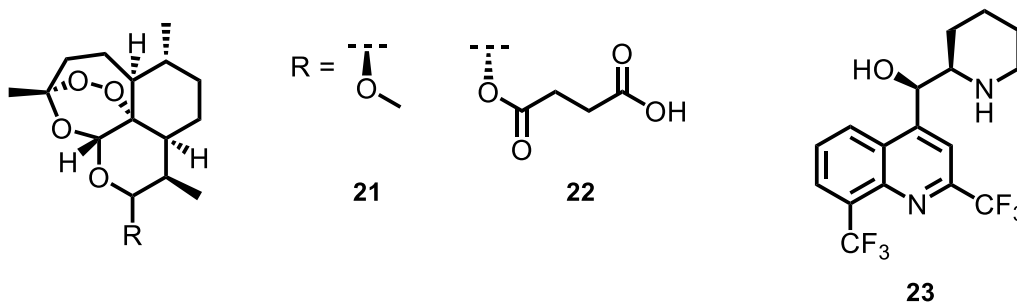
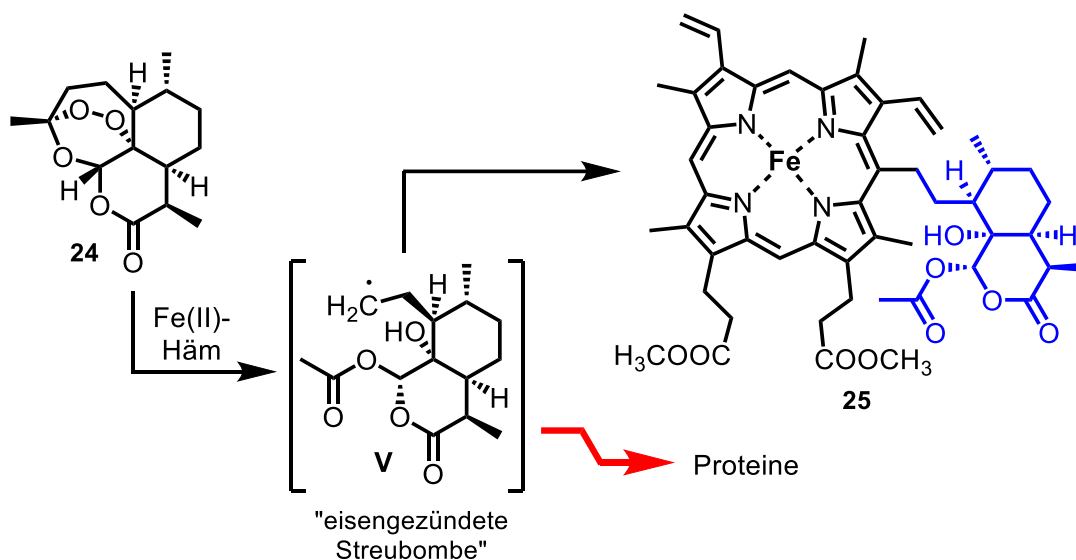


Abbildung 9: Strukturformeln von Artemether (**21**), Artesunat (**22**) und Mefloquin (**23**)

Eine kombinierte Gabe von PZQ und ART-Derivaten sollte aufgrund der unterschiedlichen Effektivität, die jene Wirkstoffe gegenüber den verschiedenen Entwicklungsstadien der Parasiten zeigen, zu einem verbesserten Heilungserfolg führen. Deshalb wurde eine Kombinationsbehandlung im Tier untersucht. Dabei führte die Kombination von ARMT und PZQ gegenüber *S. japonicum* sowie *S. mansoni* zu einer stärkeren Reduktion der Wurmlast als bei separater Gabe.<sup>[232]</sup> ARTS hingegen beeinflusste die Wirkung von PZQ nachteilig.<sup>[233]</sup> Eine moderate Wirksamkeit von ARTM konnte zudem im Menschen bei Infektionen mit *S. japonicum* oder *S. mansoni* festgestellt werden.<sup>[234–236]</sup> Um Resistenzen in der Malariatherapie vorzubeugen, sind Artemisinin-Derivate derzeit jedoch nicht zur Behandlung der Schistosomiasis vorgesehen.<sup>[237,238]</sup>

Das für die Wirksamkeit von Artemisinin und seinen Derivaten essenzielle Strukturelement ist das Endoperoxid. Es wird angenommen, dass eine Eisen-II-vermittelte Spaltung der Endoperoxidstruktur zur Bildung von Kohlenstoffradikalen führt. Die entstandenen hochreaktiven Kohlenstoffradikale reagieren dann mit Häm oder alkylieren andere am Häm-Abbau beteiligte Proteine (**Schema 3**).<sup>[239,240]</sup>



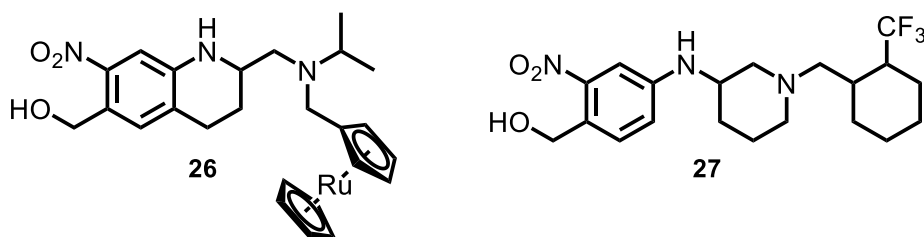
**Schema 3:** Möglicher Wirkmechanismus von Artemisinin (24) und seinen Derivaten durch Eisen-II-vermittelte Spaltung der Endoperoxidstruktur und Bildung von Hämkonjugaten (modifiziert nach Schlitzer)<sup>[241]</sup>

Auch das Antimalariamittel Mefloquin (MFQ; 23), ein Chinolin-Derivat, wurde gegen die Schistosomiasis getestet und war gegenüber *S. mansoni* und *S. japonicum* im Mausmodell aktiv. So kam es unabhängig vom Entwicklungsstadium der Parasiten nach einmaliger Gabe von 200-400 mg·kg<sup>-1</sup> zu einem Rückgang der Parasitenlast von 87-95%.<sup>[242]</sup> Es konnten starke Schädigung des Teguments, der darunter liegenden Gewebe und im Besonderen der Vitellinzellen beobachtet werden.<sup>[195,243]</sup> Eine Kombinationstherapie aus MFQ und PZQ an mit juvenilen und adulten *S. mansoni*-Würmern infizierten Mäusen war auch hier effektiver als der jeweils einzeln verabreichte Wirkstoff.<sup>[244]</sup> Der Wirkmechanismus ist vermutlich komplex. Neben einem Häm-abhängigen wird auch ein Häm-unabhängiger Mechanismus diskutiert.<sup>[245,246]</sup>

#### 1.1.3.4 Stand der aktuellen Forschung

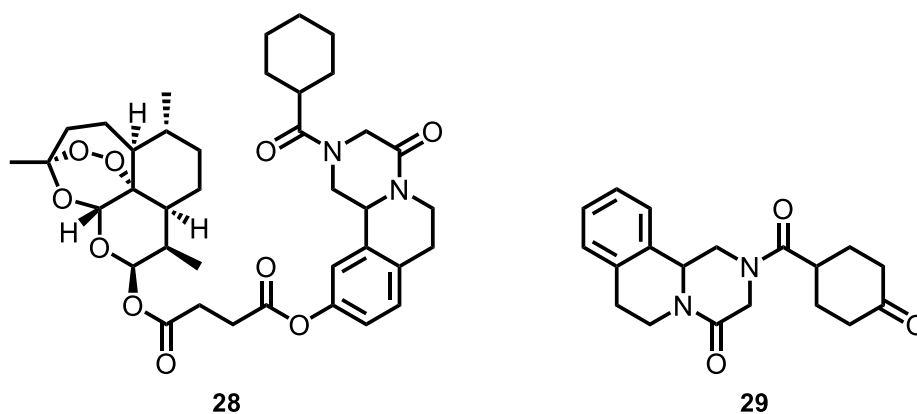
Für die Suche nach möglichen Folgekandidaten oder *back-up*-Präparaten für das PZQ und somit neuartigen antischistosomalen Verbindungen gibt es verschiedene Strategien und Herangehensweisen. Zu diesen gehört auch die Weiterentwicklung und damit die chemische Modifikation von bereits bestehenden Wirkstoffen durch das Darstellen von Struktur-Analoga. Während sich diese für das PZQ überwiegend darauf beschränkt, das antischistosomale Potential des Wirkstoffs auch auf das juvenile Stadium zu übertragen, ist sie bei OXA auf die

Ausweitung der antischistosomalen Aktivität auf andere Schistosomenspezies fokussiert. Im letzten Fall umfasst die Strategie neben dem simplen Austausch von Substituenten auch größere Strukturmodule, beispielsweise auch die Konjugation mit einer organometallischen Komponente. So brachte etwa die Verknüpfung von OXA mit einem Ferrocenyl-Rest oder einem Ruthenium-Sandwichkomplex eine Ausweitung des Aktivitätsprofils. Verbindung **26** war bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gleichwohl gegenüber *S. haematobium* aktiv und tötete nach 24 h 100% aller männlichen Würmer ( $\text{IC}_{50}$ -Wert nach 72 h: 24,5  $\mu\text{M}$ ).<sup>[247]</sup> Dabei zeigte es eine ähnliche Aktivität wie OXA gegenüber *S. mansoni* *in vitro* und *in vivo*.<sup>[248]</sup> Ein anderer strukturbasierter Ansatz führte zu **27**, welches bei einer Konzentration von 143  $\mu\text{M}$  gegen alle drei Hauptspezies *in vitro* aktiv war (*S. mansoni*: 75%, *S. haematobium*: 40%, *S. japonicum*: 83%).<sup>[249]</sup>



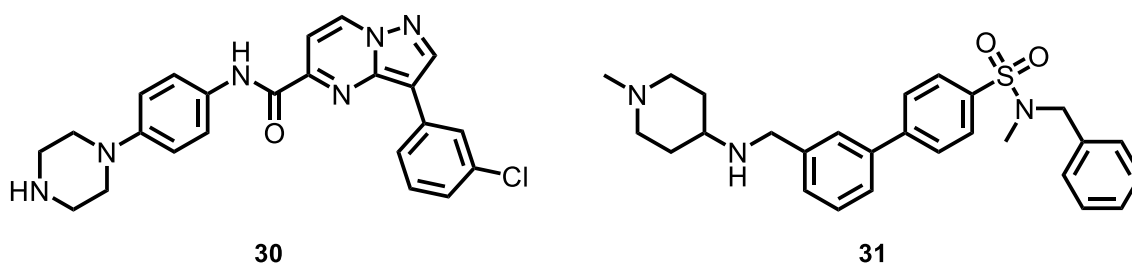
**Abbildung 10:** Beispiele für strukturbasierte Weiterentwicklungen von Oxamniquin (OXA)

Die chemische Verknüpfung von PZQ mit einem Artemisinin-Derivat, also beider gegenüber unterschiedlichen Stadien der Schistosomen aktiven Pharmakophore, brachte indessen einen Aktivitätsgewinn gegenüber dem juvenilen Stadium von *S. japonicum*. *In vitro* tötete **28** nach 24 h bei einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  100% aller Juvenilen. Auch *in vivo* verursachte **28** eine Wurmreduktion von 70% der Juvenilen (PZQ: 20%). Ferner war **28** gegenüber den Adulten aktiver als PZQ selbst.<sup>[250]</sup> Das Keton **29**, welches als Oxidationsprodukt des Hauptmetaboliten von PZQ gezielt dargestellt wurde, um dessen metabolische Stabilität zu erhöhen, führte ebenso zu einer Ausweitung des Aktivitätsprofils insbesondere gegenüber dem juvenilen Stadium von *S. japonicum* *in vivo*. Während bei *S. mansoni* eine Wurmreduktion von 25% (PZQ: 7%) beobachtet wurde, lag diese bei *S. japonicum* bei 60%.<sup>[251]</sup>



**Abbildung 11:** Beispiele für strukturbasierte Weiterentwicklungen von Praziquantel

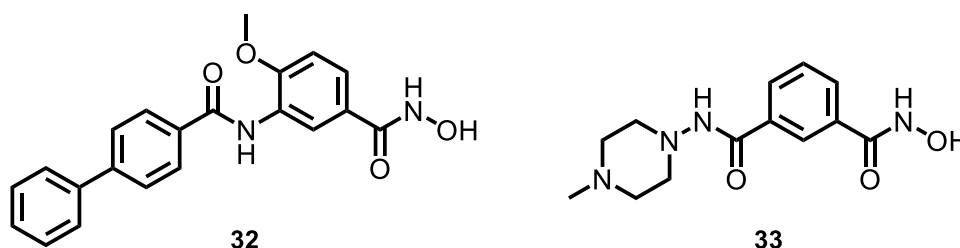
Neben der Strukturmodifikation bekannter Wirkstoffe gegen die Schistosomiasis bietet das phänotypische *Screening* eine Möglichkeit, neue Ansatzpunkte für eine darauffolgende Strukturoptimierung zu finden. In einer oftmals hochautomatisierten Testung werden dazu ganze Substanzbibliotheken *in vitro* auf ihre antischistosomale Aktivität zumeist gegenüber Juvenilen getestet. Wurde eine aktive Verbindung gefunden, schließen sich weitergehende Studien hinsichtlich der Struktur und ihrer Wirkung an. Das Pyrazolopyrimidin-5-carboxamid **30** ist ein aktuelles Beispiel für eine Verbindung, die aus einem *high-throughput-screening* (HTS) hervorgegangen ist. Es zeigte eine gute Aktivität gegenüber dem juvenilen sowie dem adulten Stadium von *S. mansoni* (IC<sub>50</sub>-Wert nach 72 h: NTS (*newly transformed schistosomula*) = 0,6 µM; Adulte = 2,0 µM) und war bei einer Konzentration von 10 µM auch gegenüber Adulten von *S. haematobium* zu 100% wirksam. *In vivo* reduzierte es die Wurmlast in mit *S. mansoni*-infizierten Mäusen um 71% (nach peroraler Gabe von 200 mg/kg).<sup>[252]</sup> Biarylsulfonamid **31** wurde ebenfalls im Zuge eines *Screenings* gefunden. Es besitzt ein ähnliches Wirkprofil gegenüber *S. mansoni* (IC<sub>50</sub>-Wert nach 72 h: NTS = 2,6 µM; Adulte = 3,0 µM; WBR (*worm burden reduction*) = 68%).<sup>[252]</sup>



**Abbildung 12:** Beispiele für antischistosomal aktive Verbindungen, die aus einem phänotypischen HTS hervorgehen

Eine andere Strategie ist der Target-basierte Ansatz. Zn<sup>2+</sup>- oder NAD<sup>+</sup>-abhängige Histon-Deacetylasen (HDAC), die Acetylgruppen von acetyliertem Lysin auf dem *N*-terminalen Histonende entfernen, sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Durch die Deacetylierung

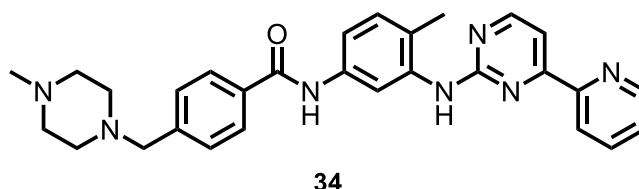
bekommt die Seitenkette der Aminosäure Lysin wieder eine positive elektrische Ladung, wodurch sich ihre Affinität für das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA erhöht. In *S. mansoni* konnten sechs Gene nachgewiesen werden, die  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängige HDACs codieren. Diese lassen sich nach ihrer Sequenz- und Domänenverwandtschaft in verschiedene Klassen einteilen. Klasse I, welche sich aus den schistosomalen HDACs 1, 3 und 8 zusammensetzt, ist die am häufigsten vorkommende.<sup>[253]</sup> Sie ist in allen Stadien des Lebenszyklus enthalten, wobei SmHDAC8 dabei am meisten vertreten ist und für das Überleben des Parasiten sowie dessen Reifung wichtig ist.<sup>[254]</sup> Computerunterstütztes *Screening* an einem Model von SmHDAC8 mit bekannten humanen HDAC8-Inhibitoren führte zu mehreren *Hit*-Strukturen, die allesamt einer *in-vitro*-Testung unterzogen wurden.<sup>[255]</sup> Die besten Ergebnisse erzielten 3-Amidobenzo-hydroxamate, deren Weiterentwicklung **32** hervorbrachte, das eine gute Aktivität bei einer Konzentration von  $0,075 \mu\text{M}$  gegenüber der SmHDAC8 zeigte. Es besaß eine Selektivität gegenüber hHDAC1 und hHDAC6, aber nicht gegenüber hHDAC8. Bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  erzielte **32** einen letalen Effekt nach 48 h gegenüber Schistosomula. Adulte Schistosomen waren aber bei einer Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  ebenfalls betroffen. Nach fünf Tagen waren 90% der Paare entpaart und die Eiproduktion war um 80% reduziert.<sup>[256]</sup> **33**, ein Isophthalsäure-Derivat, stellt einen weiteren Vertreter der HDAC-Inhibitoren dar, der im Vergleich zu **32** allerdings mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,75 \mu\text{M}$  weniger wirksam, dafür selektiver war (ausgenommen sei hier die hHDAC8).<sup>[257]</sup>



**Abbildung 13:** Strukturformeln antischistosomal aktiver Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Ein anderes interessantes Target stellen Kinasen dar, die einen Phosphatrest von zumeist Adenosintriphosphat (ATP) auf andere Substrate übertragen und diese dadurch aktivieren. Die Kinasen lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen: die Protein-Kinasen (PKs), die die Hydroxylgruppen von Aminosäureseitenketten phosphorylieren und die nicht Protein-Kinasen, die Nucleotide, Kohlenhydrate, Vitamine oder Lipide phosphorylieren. Adulte Schistosomen der Art *S. mansoni* besitzen in ihrem Genom insgesamt 268 PKs, von denen Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) einen Großteil ausmachen.<sup>[258,259]</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass PTKs in den Gonaden (Keimdrüsen, in denen sämtliche Keimzellen gebildet werden) von männlichen und weiblichen Schistosomen vorkommen und damit eine essenzielle Rolle für die

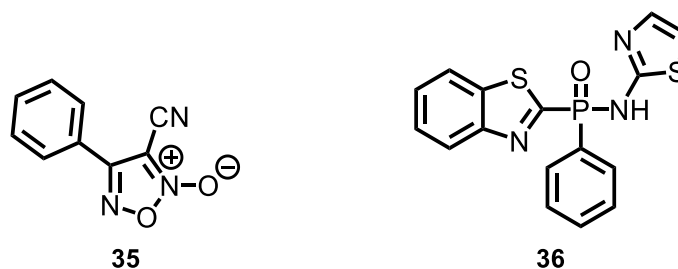
Reproduktionsbiologie spielen.<sup>[260,261]</sup> Ein prominentes Beispiel für einen PTK-Inhibitor, der in der Krebstherapie am Menschen erprobt und auch gegenüber Schistosomen bei Konzentrationen von 10-100  $\mu\text{M}$  *in vitro* getestet wurde, ist Imatinib (**34**).<sup>[262]</sup> Es zeigte einen Einfluss auf die Paarungsstabilität der Schistosomen. Weiterhin wurde die Oogenese (die Entwicklung einer befruchtungsfähigen Eizelle aus einer Zelle der Keimbahn) und die Spermatogenese (Bildung von Spermien) gestört. Die Gastrodermis wurde massiv geschädigt und dies führte schließlich zum Tod der Schistosomen.<sup>[263]</sup> Auch *in vivo* trat ein letaler Effekt ein.<sup>[264]</sup> Biochemische Analysen und *in-silico-docking* lassen die schistosomale Tyrosinkinase Abl2 als potenzielles Target erscheinen.<sup>[265]</sup>



**Abbildung 14:** Strukturformel des antischistosomal aktiven Tyrosin-Kinase-Inhibitors Imatinib (**34**)

Als letzter Angriffspunkt für einen Inhibitor soll an dieser Stelle die Thioredoxin-Glutathion-Reduktase (TGR) Erwähnung finden. Glutathion ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin, das als eine Art Redox-Puffer fungiert und sowohl oxidiert als auch reduziert werden kann. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS). Dabei wirkt es mit seiner freien SH-Gruppe des Cysteins als Radikalfänger und bildet ein Glutathiondisulfid. Thioredoxin wiederum ist ein kleines Protein mit einer Disulfidbrücke im aktiven Zentrum, das in der reduzierten Form enzymatisch als Oxidoreduktase fungiert und gleichwohl als Antioxidans aktiv ist. Die TGR als multifunktionales Enzym stellt den reduzierten Ausgangszustand beider Redoxsysteme durch NADPH-abhängigen Elektronenübergang letztlich wieder her.<sup>[266–269]</sup> Wie knockdown-Experimente an Schistosomen zeigen konnten, ist die Funktionsfähigkeit der TGR für deren Überleben von herausragender Bedeutung.<sup>[270,271]</sup> Gezielte Suche nach SmTGR-Inhibitoren führte zur Stoffklasse der Oxadiazol-2-oxide und der weniger aktiven Phosphinsäureamide.<sup>[272]</sup> Einer der aktivsten Vertreter mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 6,3  $\mu\text{M}$  ist Verbindung **35**, die gegen alle drei Hauptspezies, die den Menschen infizieren, gleichermaßen aktiv war. Die Wirkung erwies sich dabei als unabhängig vom Stadium im Lebenszyklus des Parasiten. So tötete **35** bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nach 24 h alle Würmer *in vitro*. Auch zeigte **35** geringe Zytotoxizität, hohe Bioverfügbarkeit sowie Selektivität gegenüber der humanen TGR und war auch *in vivo* aktiv.<sup>[273,274]</sup> Der Wirkmechanismus beruht dabei auf der Freisetzung von Stickstoffmonoxid. **36**, ein im Gegensatz zu **35** reversibler SmTGR-Inhibitor, benötigte 96 h bei einer

Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  für einen 100%-igen letalen Effekt. Unterhalb von 25  $\mu\text{M}$  war er dann jedoch inaktiv.

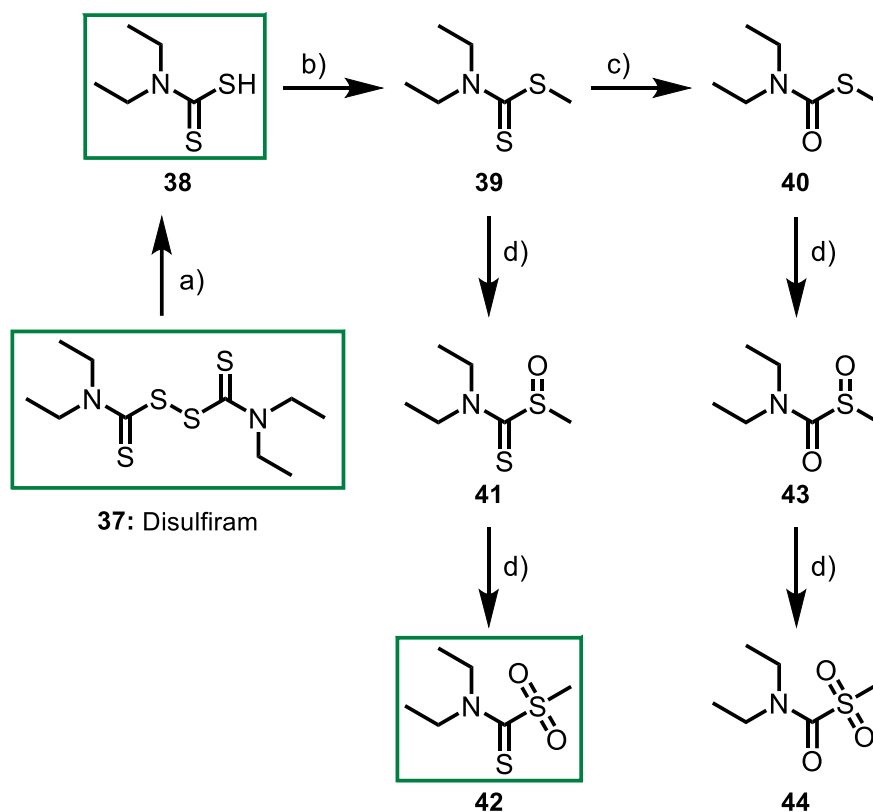


**Abbildung 15:** Strukturformeln antischistosomally aktiver Thioredoxin-Glutathion-Redukase-Inhibitoren

#### 1.1.3.5 Vorarbeiten zu Disulfiram und Dithiocarbamat-Derivaten

Untersuchungen tegumentaler Proteine sowie Genomdatenanalysen von *S. mansoni* führten im Arbeitskreis GREVELDING zur Identifizierung von Aldehyddehydrogenasen (ALDH) als mögliches *drug target*. *In-vitro*-Experimente mit Disulfiram (37), dem bekannten Inhibitor der humanen ALDH und einem früher verwendeten Mittel zur Bekämpfung der Alkoholabhängigkeit, zeigten bei Konzentrationen bis 50  $\mu\text{M}$  in kurzer Zeit antischistosome Aktivität.<sup>[275,276]</sup> Neben morphologischen Veränderungen des Teguments kam es zur Entpaarung aller Schistosomen-Paare und zu einer damit verbundenen Inhibition der Eiproduktion, zu stark reduzierter Motilität sowie Vitalität und letztlich gar zum Tod des Parasiten. Im Mausmodell führte Disulfiram bei *S. mansoni* insbesondere zur Produktion deformierter Eier, jedoch nicht zur Entpaarung oder dem Auftreten von Tegumentschäden.<sup>[277]</sup> Da die Wirkung von Disulfiram gegenüber der humanen ALDH auch auf dessen Verstoffwechselung in aktive Metaboliten gemäß **Schema 4** beruht, wurden auch diese auf ihre antischistosome Wirkung hin untersucht.<sup>[278–280]</sup> Dabei zeigten die beiden Metaboliten **38** und **42** bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine mit Disulfiram vergleichbare antischistosome Aktivität, waren bei niedrigeren getesteten Konzentrationen dann aber inaktiv. Dies deutet darauf hin, dass der Wirkmechanismus nicht auf der Inhibition einer möglichen schistosomalen Aldehyddehydrogenase beruht, da aufgrund des Wegfalles der Metabolisierung eher eine erhöhte Aktivität zu erwarten wäre. Die Aufklärung des Wirkmechanismus von Disulfiram wird durch die Tatsache, dass Dithiocarbamate chelatisierende Eigenschaften besitzen und ubiquitär vorkommende Metalloproteine durch Bindung zweiwertiger Metallkationen (wie z.B.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$ ) hemmen, zusätzlich erschwert.<sup>[281–284]</sup>

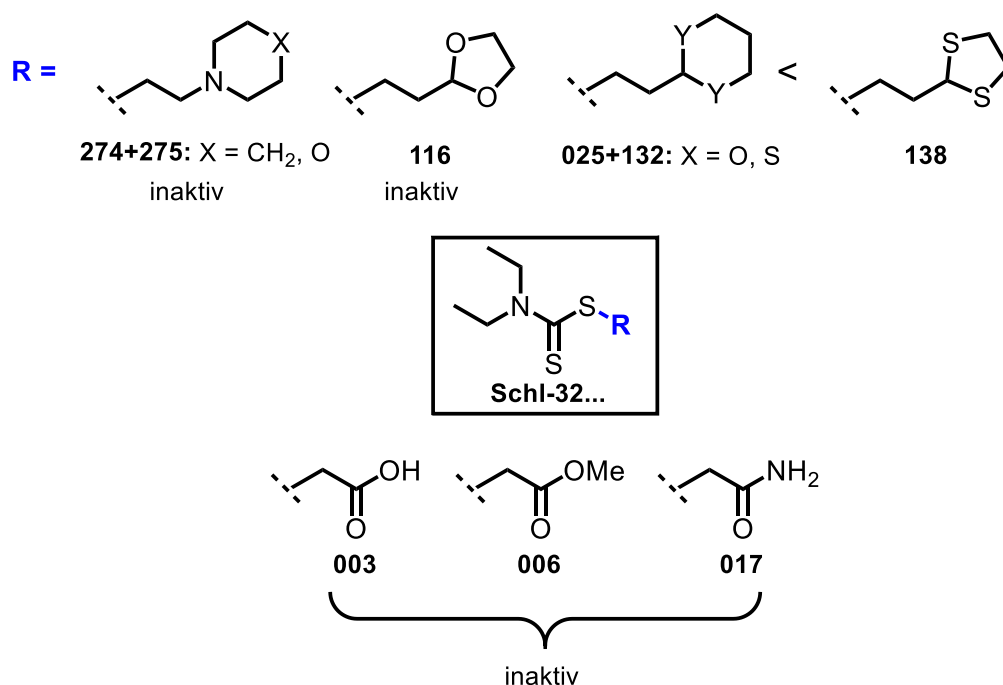




**Schema 4:** Metabolisierungspfad von Disulfiram (37)<sup>[280]</sup>

Biotransformationsschritte sind über den Reaktionspfeilen gekennzeichnet: a) Reduktion; b) Thiolmethyltransferase; c) Desulfurierung; d) Oxidation durch CYP-Enzyme. Metabolite, bei denen antischistosome Aktivität nachgewiesen werden konnte, sind grün umrandet.

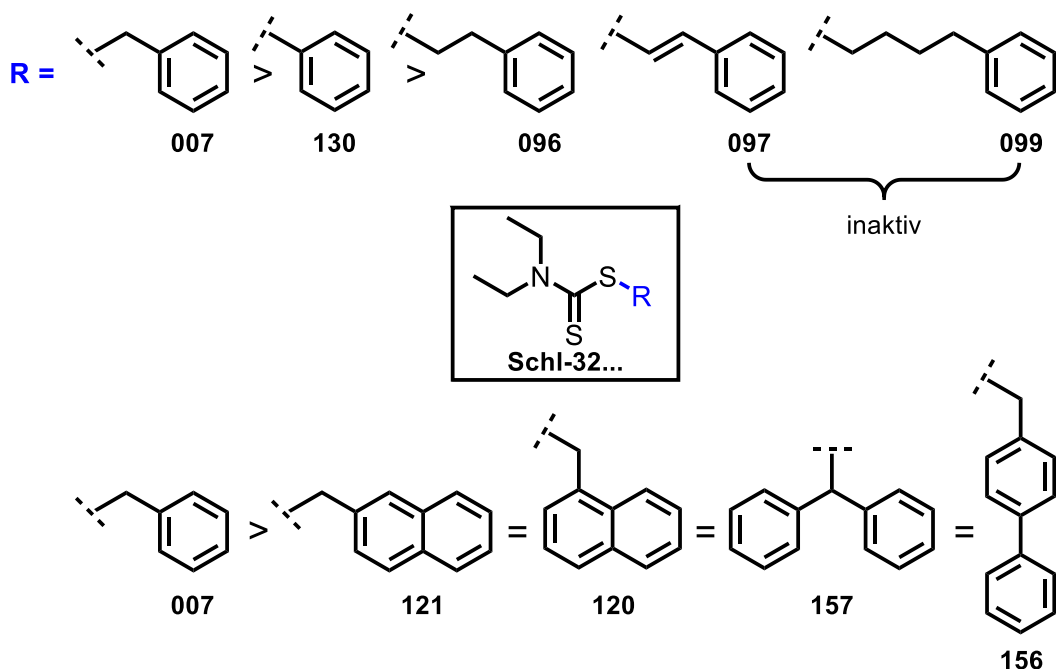
Dennoch ist der Einsatz von Disulfiram als antischistosome Wirkstoff aufgrund seiner hochgradigen Lebertoxizität und zahlreichen toxischen Abbauprodukten abzuzuraten.<sup>[285]</sup> Da die beiden *in vitro* wirksamen Metaboliten 38 und 42 wie auch das Disulfiram keinen sinnvollen Ansatzpunkt für eine rationale Strukturoptimierung bieten, wurde der synthetisch am besten zugängliche Metabolit 39, der selbst inaktiv gegenüber Schistosomen der Art *S. mansoni* ist, im Arbeitskreis SCHLITZER als Grundstruktur für weitere Synthesen genutzt.<sup>[286]</sup> Am Dithiocarbamat lassen sich insgesamt drei unterschiedliche Reste einführen, die im Weiteren nacheinander variiert wurden. In ersten Optimierungsserien wurde zunächst der Substituent am Schwefel des Dithiocarbamats variiert. Die *N,N*-Diethyldithiocarbamat-Grundstruktur wurde dabei beibehalten (Abb. 16-17).



**Abbildung 16:** *N,N*-Diethyldithiocarbamat-Derivate mit hydrophilen oder schwach hydrophilen Substituenten

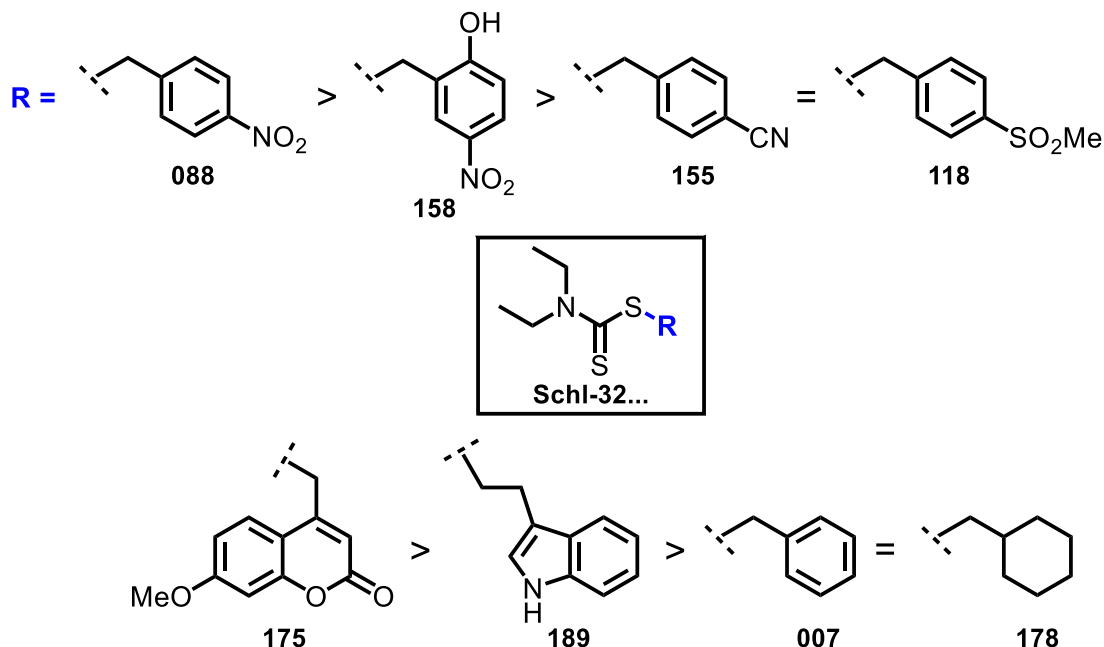
Es zeigte sich, dass Derivate mit einem hydrophilen Substituenten (**Schl-32.003**, **Schl-32.006**, **Schl-32.017**) wie auch basische Gruppen (**Schl-32.274**, **Schl-32.275**) keinerlei antischistosomale Wirkung bei einer Konzentration von initial 100  $\mu\text{M}$  besaßen. Das Dioxan-Derivat **Schl-32.025** zeigte jedoch einen schwachen inhibitorischen Effekt. Dieser konnte auch für das Dithian **Schl-32.132** beobachtet werden. Das entsprechende Dioxolan-Derivat **Schl-32.116** aber war inaktiv, wohingegen das Dithiolan-Derivat **Schl-32.138** verglichen mit dem Dioxan-Derivat **Schl-32.025** zu einer erhöhten Aktivität führte. Jedoch wurden die Acetal-Derivate aufgrund ihres stark zytotoxischen Potentials, den diese bereits ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  aufwiesen, wieder verworfen.

Außer den Acetal-Derivaten zeigte auch der deutlich lipophile Benzyl-Substituent (**Schl-32.007**) eine antischistosomale Aktivität bis hin zu einer Konzentration von  $\sim 25 \mu\text{M}$ . Die darauffolgende Variation der Kettenlänge ergab, dass mit einer Verlängerung und Verkürzung des Linkers eine Wirkminderung einhergeht, wobei der Phenyl-Substituent (**Schl-32.130**) gegenüber dem Phenethylsubstituenten (**Schl-32.096**) bevorzugt wurde. Ab einer Kettenlänge von vier Methyleinheiten (**Schl-32.099**) ging dann die antischistosomale Aktivität gänzlich verloren. Diese wurde auch nach der Rigidisierung des Linkers (**Schl-32.097**) nicht mehr beobachtet. Der Austausch des Benzylsubstituenten durch sterisch anspruchsvolle Gruppen wie Naphthylmethyl- (**Schl-32.120/121**), Benzhydryl- (**Schl-32.157**) oder (Biphenyl-4-yl)methyl-Reste (**Schl-32.156**) zeigte, dass diese zumindest bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , jedoch nicht mehr darunter, ebenso geduldet wurden.



**Abbildung 17:** *N,N*-Diethyldithiocarbamat-Derivate mit veränderter Kettenlänge des Linkers und sterisch anspruchsvollen Substituenten R

Weiterhin wurde der Aromat durch Einführung elektronenschiebender sowie -ziehender Substituenten funktionalisiert. Vor allem in *para*-Position des Benzylsubstituenten funktionalisierte Verbindungen zeigten eine sehr gute antischistosomale Aktivität (**Abb. 18**).

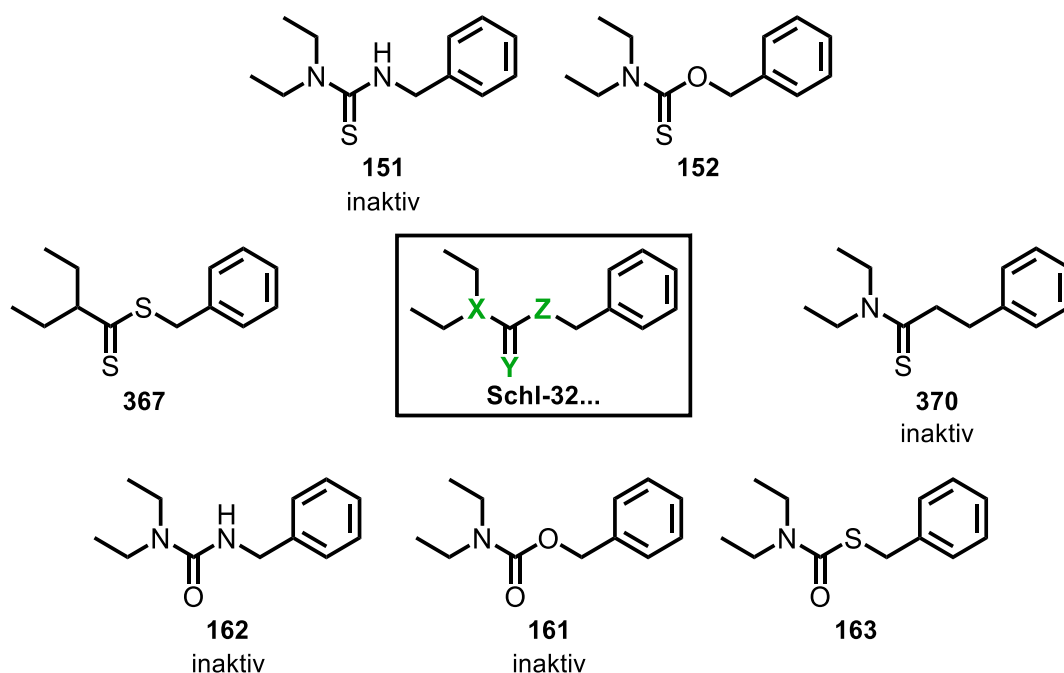


**Abbildung 18:** Übersicht der wirksamsten Substituenten R am einfach gebundenen Schwefelatom des Dithiocarbamats

Insbesondere gilt dies für das 4-Nitrobenzyl-Derivat **Schl-32.088**, das auch noch bei einer Konzentration  $< 25 \mu\text{M}$  aktiv war. Das 4-Cyanbenzyl-Derivat **Schl-32.155** zeigte ähnliche Effekte, war im Vergleich zum 4-Nitrobenzyl-Derivat **Schl-32.088** jedoch weniger aktiv. Die

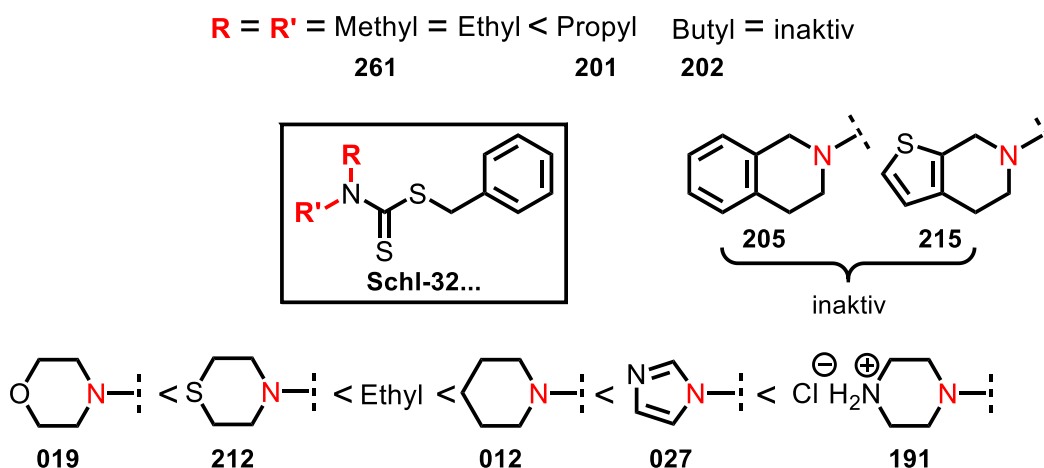
Aktivität des 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivats **Schl-32.118** wiederum glich in etwa der des 4-Cyanbenzyl-Derivats **Schl-32.155**. Eine nur leicht verminderte Aktivität gegenüber dem 4-Nitrobenzyl-Derivat **Schl-32.088** zeigte das 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Derivat **Schl-32.158**, bei dem der aromatische Ring entgegen den bisherigen Annahmen an ungünstigen Stellen funktionalisiert wurde. Der Austausch des Phenyl-Rings durch einen Cumarin- (**Schl-32.175**) oder einen elektronenreichen Indolyl-Rest (**Schl-32.189**) oder einen Cyclohexyl-Rest (**Schl-32.178**) wurde mit abnehmender Aktivität ebenfalls toleriert.

Darauffolgend wurde die Notwendigkeit der Dithiocarbamat-Grundstruktur untersucht. Das einfach und doppelt gebundene Schwefelatom des Dithiocarbamats, aber auch das Stickstoffatom wurden hierzu sukzessive gegen andere Heteroatome (x, y, z) ausgetauscht (**Abb. 19**). Es zeigte sich, dass mit dem Austausch des Dithiocarbamats ein drastischer Aktivitätsverlust verbunden war. Das Vorliegen des Dithiocarbamat-Grundgerüsts scheint somit eine notwendige Bedingung für die Wirksamkeit einer chemischen Verbindung zu sein. Während das (Thio)harnstoff- (**Schl-32.151/162**), Carbamat- (**Schl-32.161**) und Carbonsäurethioamid-Derivat **Schl-32.370** keinerlei antischistosomale Aktivität bei 100  $\mu\text{M}$  zeigten, war die des Thionurethan- (**Schl-32.152**), Thiolurethan- (**Schl-32.163**) und Dithioester-Derivats **Schl-32.367** stark eingeschränkt.



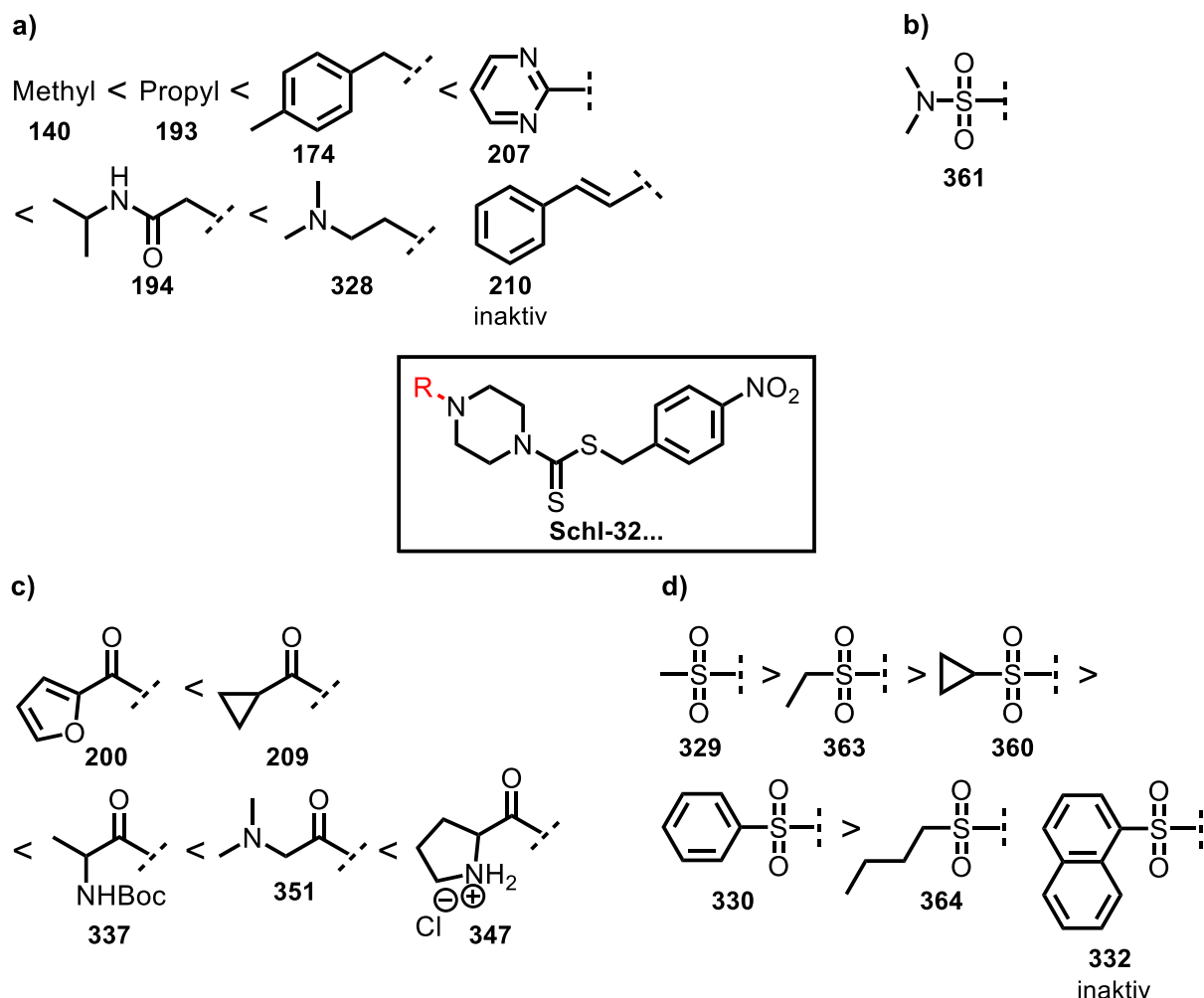
**Abbildung 19:** Variation der Heteroatome (x, y, z) des Dithiocarbamats

Schließlich wurde der in den ersten Optimierungsserien initial gefundene Benzylsubstituent am Schwefel des Dithiocarbamats beibehalten und die Substituenten R und R' am Dithiocarbamat-Stickstoff wurden variiert (**Abb. 20**). Die Ethylsubstituenten wurden dabei zunächst gegen



Am freien Stickstoffatom des Piperazin-Ringes wurden weiterhin nun Substituenten unter Aufrechterhaltung der Basizität eingeführt (**Abb. 21a**). Dabei zeigte sich, dass Verbindungen mit aliphatischen Ketten mit zunehmender Kettenlänge an Aktivität gewannen (**Schl-32.140/193**). Einen weiteren Anstieg der Aktivität brachten Arylalkyl-Substituenten (**Schl-32.174**) gefolgt von Arylsubstituenten (**Schl-32.207**). Auch Substituenten mit polaren Kopfgruppen beispielsweise ein (2-(Isopropylamino)-2-oxoethyl- (**Schl-32.194**) oder ein 2-(Dimethylamino)ethyl-Rest (**Schl-32.328**) waren für einen Zugewinn der Aktivität

förderlich. Rigide Körper wie ein Cinnamyl-Derivat (**Schl-32.210**) wurden indessen nicht toleriert. Des Weiteren wurde die Acylierung des Stickstoffatoms überprüft (**Abb. 21c**). Dabei zeigte sich, dass insbesondere ein Cyclopropancarbonyl- (**Schl-32.209**) und Furoyl-Rest (**Schl-32.200**) geduldet wurden. Die Konjugation mit Aminosäuren war gleichwohl erfolgreich. Beste Resultate erzielten Boc-Alanin (**Schl-32.337**), *N,N*-Dimethylglycin (**Schl-32.351**) und Prolin-Hydrochlorid (**Schl-32.347**). Die Carbonsäureamid-Struktur brachte in der Summe eine gesteigerte antischistosomale Aktivität, ging jedoch mit einer erhöhten Zytotoxizität einher. Diesem Umstand wurde mit der Einführung eines Sulfonamids und somit der Erhöhung der Hydrophilie begegnet (**Abb. 21d**). Kleine Alkylsulfonamid-Derivate (**Schl-32.329/360/363**) wurden dargestellt und waren bis zu einer Kettenlänge eines Butylrestes (**Schl-32.364**) bei Konzentrationen  $< 25 \mu\text{M}$  aktiv und bis  $100 \mu\text{M}$  nicht zytotoxisch; allerdings nahm die Wirksamkeit mit steigender Kettenlänge ab. Arylsulfonamide (**Schl-32.332**) waren mit Ausnahme eines Phenyl-Derivates (**Schl-32.330**) inaktiv. Ein *N,N*-Dimethylsulfamoyl-Derivat (**Schl-32.361**) wurde ebenfalls dargestellt und zeigte Aktivität (**Abb. 21b**).



**Abbildung 21:** *N*-substituierte Piperazin-Derivate mit 4-Nitrobenzyl-Rest durch Alkylierung, Acylierung, Sulfonylierung und Sulfamoylierung des Restes R. **Schl-32.140/174/193/200/207/209** und **Schl-32.210** tragen keine *para*-Nitrogruppe am *S*-Benzylsubstituenten.

## 1.2 Schwefelsäurediamide

### 1.2.1 Medizinalchemie

Schwefelsäurediamide ( $R_2NSO_2NR_2$ ), auch Sulfamide genannt, stellen eine für die medizinische Chemie interessante Stoffklasse dar. Sie dienen als bioisosterer Ersatz für Sulfamate, Sulfonamide, Harnstoffe, Carbamate oder Amide und kommen in vielen biologisch aktiven Verbindungen vor; pharmazeutische Anwendung haben bisher aber die wenigsten.<sup>[287]</sup> Nachfolgend werden einige von ihnen vorgestellt. Dabei wird zwischen mono-, di-, tri- und tetra-substituierten Sulfamiden unterschieden.

#### Mono-substituierte Sulfamide

Doripinem (Doribax; **45**) beispielsweise ist ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum aus der Gruppe der Carbapeneme, welches ein mono-substituiertes Sulfamid trägt und bakterizide Wirkung gegen zahlreiche grampositive sowie gramnegative Erreger besitzt, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* und Enterobakterien.<sup>[288,289]</sup> Seine Wirkung beruht auf der Hemmung der Zellwandsynthese von Bakterien, was schließlich zu deren Zelltod führt. Zugelassen ist es zur Behandlung von Pneumonien, die durch nosokomiale Keime verursacht werden, aber auch zur Behandlung von komplizierten Infekten des Bauchraums und der Harnwege.<sup>[290,291]</sup>

**46** stellt einen von vielen niedermolaren Inhibitoren der humanen, cytosolischen Carboanhydrase (hCA) I und II dar.<sup>[292,293]</sup> Carboanhydrasen katalysieren eine sehr wichtige Reaktion, die Fixierung von Kohlendioxid als Bicarbonat beziehungsweise deren Rückreaktion zur Freisetzung von Kohlendioxid. Beteiligt sind sie an vielen physiologischen Prozessen wie der Atmung, dem Transport von  $CO_2/HCO_3^-$  zwischen dem metabolisierenden Gewebe und der Lunge, der pH-Einstellung, der Elektrolytsekretion, an biosynthetischen Reaktionen (Gluconeogenese, Lipogenese, Harnstoffbildung), der Knochenresorption sowie Calcifizierung und dem Tumorwachstum. Sie haben damit als Target für therapeutische Zwecke hohe Relevanz.<sup>[294–296]</sup>

Auch selektive Inhibitoren des Thrombins wie **47**, das eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Blutgerinnung spielt und am Ende einer komplex regulierten Kaskade von Serinproteasen steht, tragen das Sulfamid-Motiv in ihrer Struktur.<sup>[297,298]</sup> Thrombin spaltet hierbei letztlich das inaktive Glykoprotein Fibrinogen zu Fibrin, das daraufhin polymerisiert und weiter vernetzt wird. Es bildet sich so zunächst ein Thrombus, der eine Wunde verschließt. Thrombin-Inhibitoren reduzieren demnach die Gerinnungsfähigkeit des Blutes, was in bestimmten Situationen (beispielsweise nach einem Herzinfarkt oder Schlaganfall) zur Prävention oder bei Venenthrombosen notwendig ist.<sup>[299–301]</sup>

Ebenso eignen sich Schwefelsäurediamid-Derivate wie **48** als Inhibitoren der Carboxypeptidase A (CPA), einer Zink-Metalloprotease, die Nahrungspeptide hydrolytisch spaltet und an der Verdauung beteiligt ist.<sup>[302,303]</sup> Sie dient als Modellsystem für die bedeutenderen Vertreter der Enzymklasse wie beispielsweise den Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die Aufgaben beim Aufbau, Abbau und der Wiederherstellung von Bindegewebe nach Verletzungen oder der Angiogenese übernehmen und im Ungleichgewicht auch das Wachstum maligner Tumore zur Folge haben.<sup>[304]</sup>

Auch die Verbindungen JNJ-26990990 (**49**) und JNJ-26489112 (**50**), die von JANSSEN PHARMACEUTICA als Antikonvulsiva entwickelt wurden, enthalten ein primäres Sulfamid. Sie entstammen einer Entwicklungslinie, die ursprünglich von Topiramat (Topamax), dem Sulfamat-Analogon von **51**, einem Arzneistoff zur Behandlung der Epilepsie, ausging und gezielt zur Stoffklasse der Sulfamide führte.<sup>[305–308]</sup> Ziel war es hierbei, die durch unerwünschte Inhibition der Carboanhydrase hervorgerufenen Nebenwirkungen zu unterbinden. JNJ-26990990 hatte die klinische Phase II bereits 2007 erreicht, über weitere Details ist nichts bekannt.<sup>[309]</sup> Neuere Literaturstellen belegen nun jedoch eine starke Carboanhydrase-Inhibition.<sup>[310]</sup>

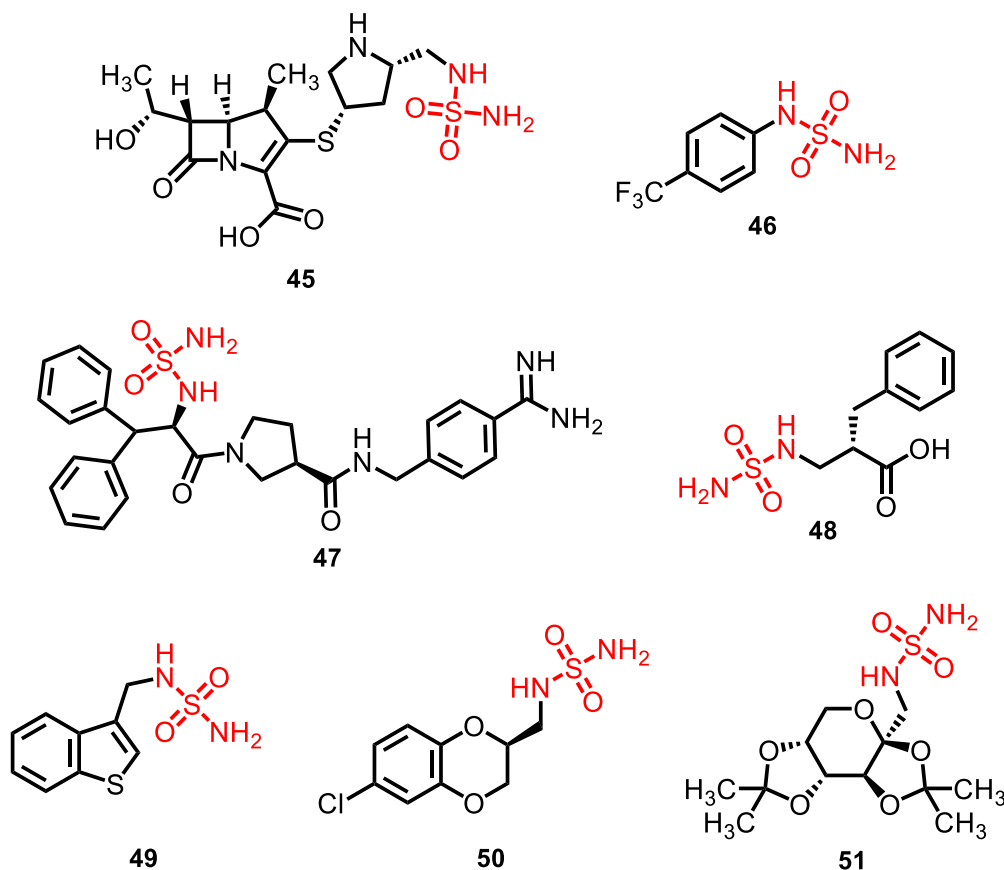


Abbildung 22: Mono-substituierte Schwefelsäurediamide



### Di-substituierte Sulfamide

Das di-substituierte Sulfamid **52** ist ein wirksamer Elastase-Hemmer.<sup>[311]</sup> Humane Leukozyten-Elastase (HLE) ist eine Serinprotease, die in der Lunge freigesetzt wird und abgestorbenes Gewebe und Bakterien zersetzt. Sie wird normalerweise durch eine Reihe endogener Inhibitoren wie beispielsweise dem  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitor kontrolliert. Wird jedoch das Gleichgewicht zwischen Protease und Inhibitor verschoben, was durch toxische, mit der Atemluft aufgenommen Substanzen verursacht werden kann, so greift die Elastase auch gesundes Lungengewebe an und dies kann letztlich auch zu Lungenemphysemen führen.<sup>[312,313]</sup>

**53** ist ein selektiver H<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist.<sup>[314]</sup> H<sub>3</sub>-Rezeptoren sind als Autorezeptoren an der Histamin-Ausschüttung beteiligt und regulieren als Heterorezeptoren die Freisetzung der Neurotransmitter Acetylcholin, Dopamin, GABA, Glutamat, Noradrenalin und Serotonin. Sie werden unter anderem mit der zentralen Regulation des Hunger- und Durstgefühls sowie des Tag-Nacht-Rhythmus in Verbindung gebracht und spielen somit eine Rolle bei der Behandlung von Übergewicht und Schlafstörungen. Darüber hinaus ist der Rezeptor beispielsweise auch an der Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen, der Schizophrenie, der Narkolepsie, der Epilepsie oder aber der ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitäts-Störung) beteiligt.<sup>[315–317]</sup>

Schwefelsäurediamide wie **54** hemmen überdies die Vermehrung von humanen Noroviren der Familie *Caliciviridae*, also unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen RNA, die als Erreger einer viralen Gastroenteritis eine große Bedeutung haben.<sup>[318,319]</sup>

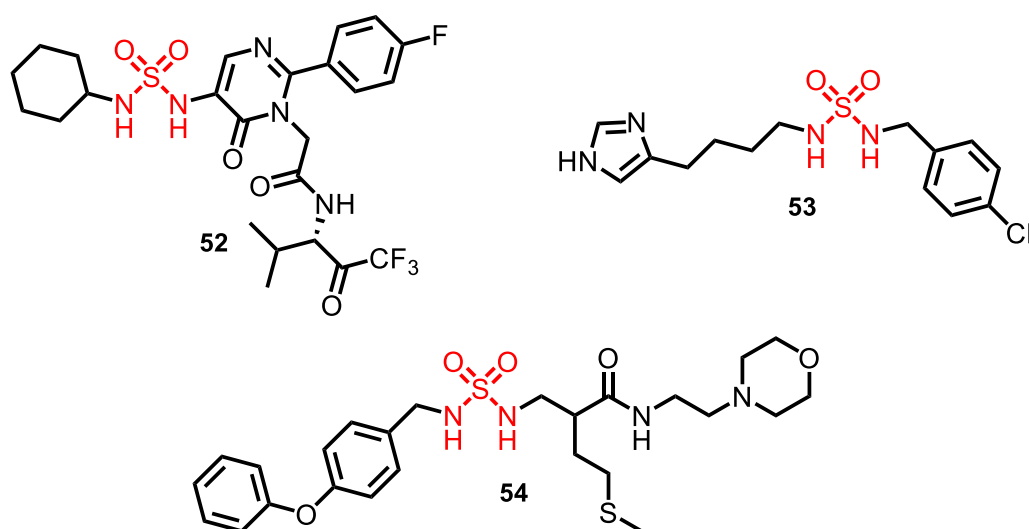


Abbildung 23: Di-substituierte Schwefelsäurediamide

### Tri-substituierte Sulfamide

Das tri-substituierte Sulfamid Quinagolid (Norprolac; **55**) hat dopaminerge Eigenschaften und bindet selektiv als Agonist an den D<sub>2</sub>-Rezeptor.<sup>[320,321]</sup> Es hemmt die Ausschüttung des Hormons Prolaktin und wird zur Behandlung krankhaft erhöhter Prolaktinspiegel im Blut (Hyperprolaktinämie) eingesetzt.<sup>[322]</sup>

PD-134672 (**56**) ist ein mäßig oral verfügbarer Renininhibitor.<sup>[323,324]</sup> Renin als Teil des sogenannten Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems ist eine Aspartylprotease, die eine Schlüsselposition im körpereigenen Regulationssystem für den Blutdruck und den Salz- und Wasserhaushalt einnimmt und das Peptid Angiotensinogen unter Bildung von Angiotensin I spaltet. Dieses wiederum wird anschließend durch eine Metalloprotease, das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), zum blutdrucksteigernden Angiotensin II gespalten.<sup>[325,326]</sup> Eine Hemmung des Enzyms Renin führt somit zu einer Erniedrigung der Konzentration von Angiotensin I und damit verbunden auch von Angiotensin II, was letztlich eine blutdrucksenkende Wirkung zur Folge hat. Es finden sich weitere Beispiele für Inhibitoren des Renins mit Schwefelsäurediamid-Motiv.<sup>[327,328]</sup>

Die von MERCK KGaA entwickelte Verbindung **57** ist ein potenter  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor.<sup>[329]</sup>  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen katalysieren die Proteolyse des integralen Amyloid-Precursor-Proteins (APP). Das aus dieser Proteolyse entstehende Fragment ist das Amyloid- $\beta$ -Protein (A $\beta$ ). Es ist wesentlicher Bestandteil der Amyloid-Ablagerungen (*senile plaques*), die im Gehirn von Alzheimer-Patienten nachgewiesen wurden und als Hauptursache dieser Krankheit diskutiert werden.<sup>[330–332]</sup>

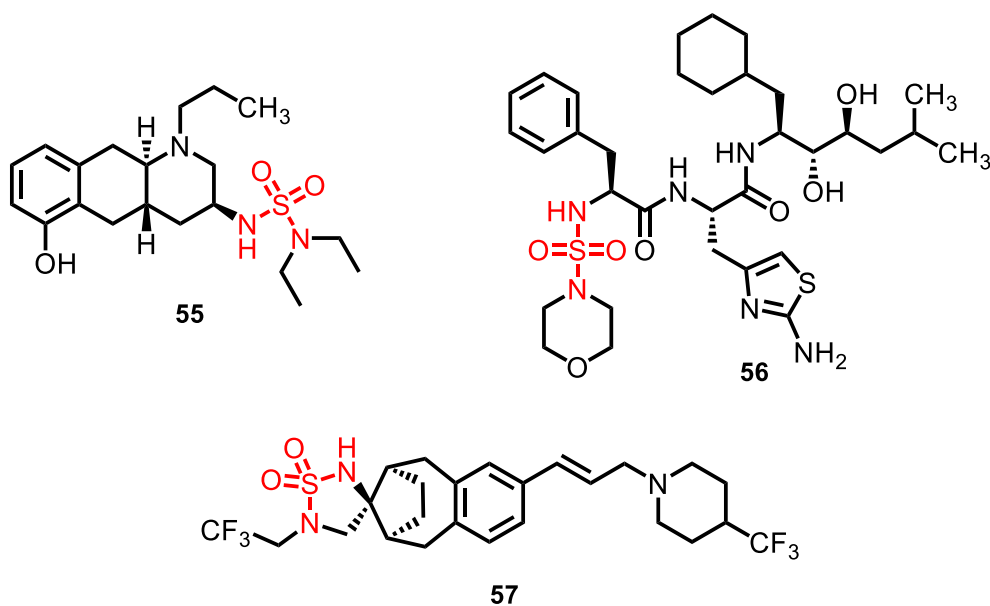


Abbildung 24: Tri-substituierte Schwefelsäurediamide

### Tetra-substituierte Sulfamide

Verbindung **58** besitzt ein tetra-substituiertes Sulfamid und ist ein Inhibitor der Metalloprotease „TNF- $\alpha$ -konvertierendes Enzym“, die den Tumornekrosefaktor (TNF) von seiner membran-gebundenen Vorform durch proteolytische Spaltung in seine aktive, lösliche Form überführt.<sup>[333]</sup> TNF ist ein multifunktionales proinflammatorisches Zytokin, das an der Steuerung des Immunsystems beteiligt ist und den Zelltod, die Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie die Ausschüttung anderer Zytokine anregt. Autoimmunbedingt vermittelt es chronisch-rheumatische Entzündungen, die Gewebsschädigungen zur Folge haben und schließlich in eine fortschreitende Zerstörung von Gelenken münden.<sup>[334–336]</sup>

Die zyklischen Schwefelsäurediamide **59** und **60** sind Vertreter einer Gruppe potenter Inhibitoren der viralen HIV-1-Protease, die zu den Aspartylproteasen gehört und in der RNA des HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) codiert ist.<sup>[337–341]</sup> Sie wird zur Vervielfältigung des Virus benötigt und spaltet funktionsuntüchtige Virus-Vorläuferproteine an bestimmten Stellen der Polypeptidkette hydrolytisch, wodurch diese in ihre funktionelle Form überführt werden. Das HI-Virus schädigt die körpereigenen Abwehrkräfte und löst unbehandelt AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) aus. Eine Inaktivierung der HIV-Protease führt demnach zur Unterbrechung der Virusreproduktion und ist eine wichtige Strategie bei der Entwicklung von anti-HIV-Medikamenten.<sup>[342,343]</sup>

Letztlich finden sich auch in der Klasse der Serotonin-, genauer der 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptor-Agonisten, Schwefelsäurediamide wie **61**. Serotoninrezeptoren sind unter anderem ein Ansatzpunkt bei der Behandlung von Migräne, die durch Fehlsteuerung biochemischer Vorgänge an den Rezeptoren hervorgerufen wird.<sup>[344,345]</sup>

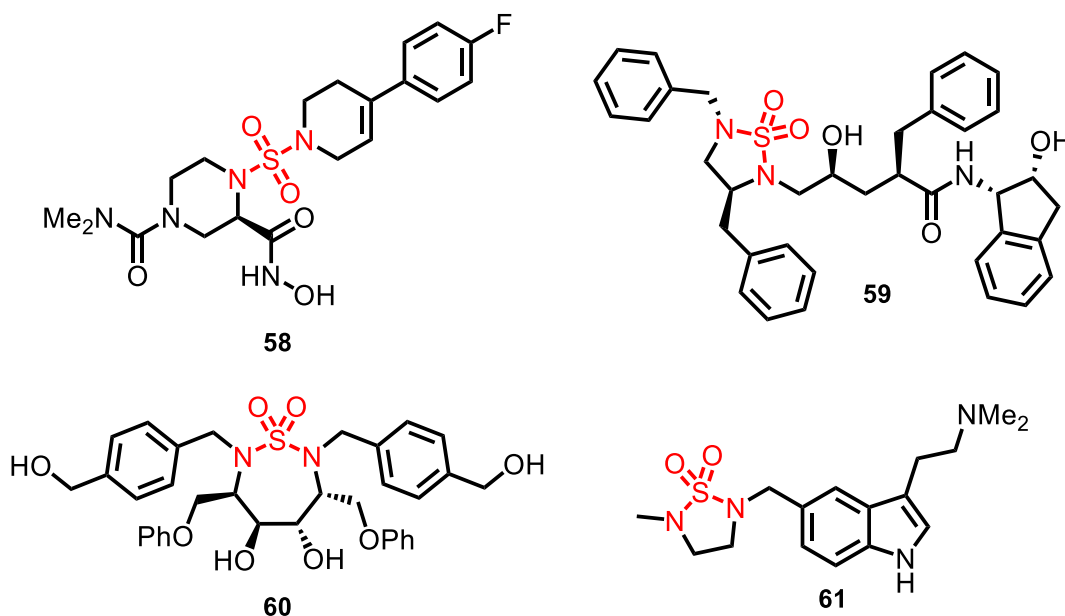


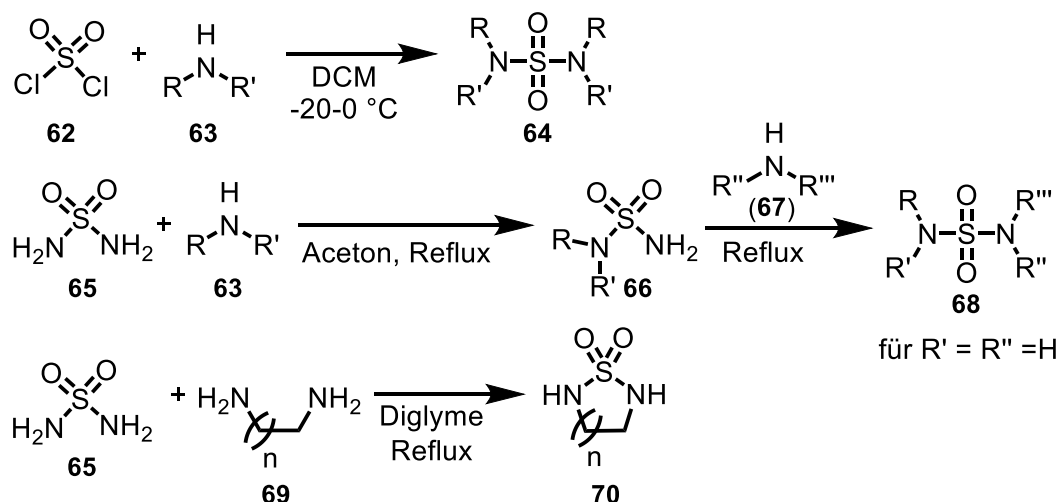
Abbildung 25: Tetra-substituierte Schwefelsäurediamide

Weitere Anwendung finden vor allem cyclische Schwefelsäurediamide als *building blocks* im Bereich der supramolekularen Chemie oder als chirale Liganden und Auxiliare.<sup>[346–349]</sup> Einen noch breiteren Überblick über den insbesondere biologischen Nutzen der Substanzklasse der Schwefelsäurediamide geben zahlreiche Reviewartikel.<sup>[287,350,351]</sup>

## 1.2.2 Synthese von Schwefelsäurediamiden

### Klassische Synthese-Verfahren

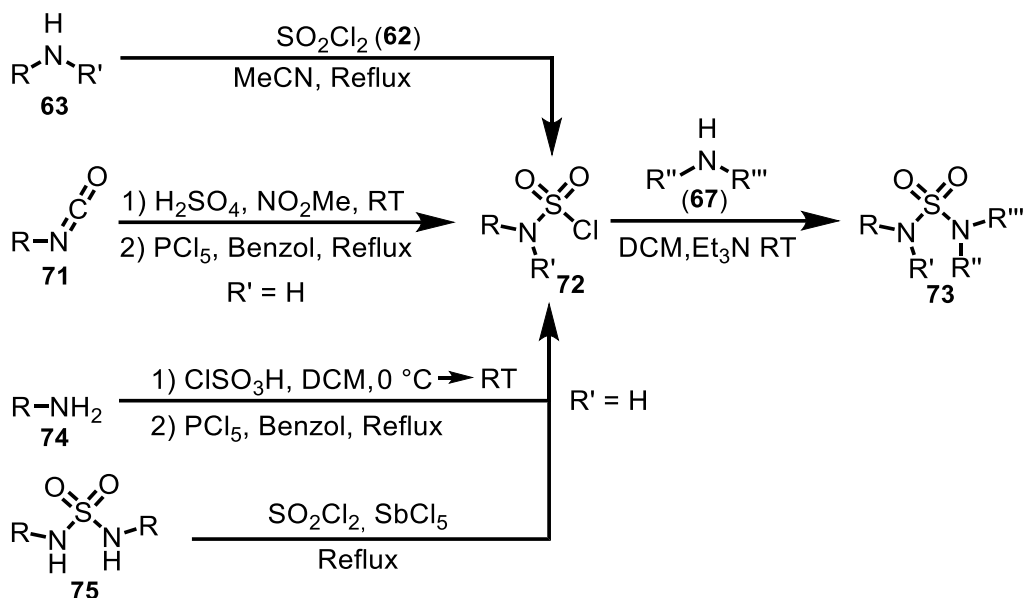
Ein klassischer Zugang zu symmetrischen, azyklischen insbesondere 1,3-disubstituierten Schwefelsäurediamiden bietet der Umsatz von Aminen (**63**) mit Sulfurylchlorid (**62**) bei 0 °C oder tieferen Temperaturen.<sup>[352,353]</sup> *N*- sowie *N,N*-substituierte Schwefelsäurediamide (**66**) können direkt durch Reaktion entsprechender Amine (**63**) mit Sulfamid (**65**) gewonnen werden.<sup>[354]</sup> Erstgenannte (**66**) lassen sich unter Rückfluss mit einem weiteren Amin (**67**) transamidieren und zu *N,N'*-substituierten Schwefelsäurediamiden (**68**) umsetzen.<sup>[355]</sup> Zyklische Schwefelsäurediamide (**70**) lassen sich indessen auch ausgehend von Diaminen (**69**) und Sulfamid (**65**) unter Refluxbedingungen erhalten (**Schema 5**).<sup>[356]</sup>



**Schema 5:** Klassische Synthesen von Schwefelsäurediamiden ausgehend von Sulfurylchlorid oder Sulfamid

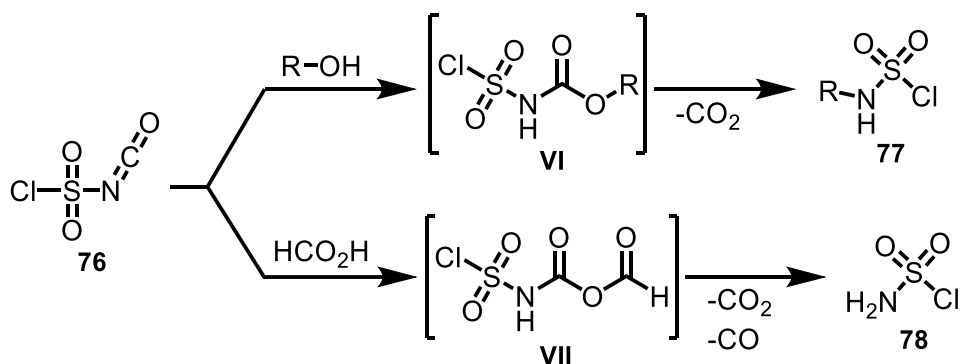
Mittels Sulfurylchlorid können laut Literatur auch unsymmetrische Schwefelsäurediamide erhalten werden (**Schema 6**).<sup>[357,358]</sup> Durch einen Überschuss an Sulfurylchlorid kann demnach aus einem Amin (**63**) oder Amin-Hydrochlorid durch Erhitzen in Acetonitril mit Sulfurylchlorid zunächst das Sulfamoylchlorid **72** gebildet werden.<sup>[359,360]</sup> Sofern keine Desaminierung erfolgt oder die symmetrische Verbindung **64** resultiert, reagiert dieses anschließend mit einem weiteren Amin (**67**) zum Schwefelsäurediamid **73** ab. Sulfamoylchlorid **72** lässt sich überdies auch ausgehend von Isocyanaten (**71**) darstellen, die nach Behandlung mit Schwefelsäure zunächst unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid in die entsprechenden Schwefelsäuremonoamide übergehen.<sup>[361]</sup> Letztere ergeben sich auch nach

Reaktion eines Amins (**74**) mit Schwefelsäuremonochlorid und können mit Phosphorpentachlorid in das etwaige Sulfamoylchlorid **72** überführt werden.<sup>[362,363]</sup> Erhitzt man *N,N'*-Dialkylsulfonyldiamid **75** in überschüssigem Sulfurylchlorid für längere Zeit unter Rückfluss, bildet sich ebenfalls Sulfamoylchlorid **72**. Durch Lewis-Säuren, die eine Dissoziation des Sulfurylchlorids bewirken, lässt sich die Ausbeute erhöhen.<sup>[360]</sup>



**Schema 6:** Klassische Synthesen von Schwefelsäurediamiden über Sulfamoylchloride

Chlorsulfonylisocyanat (**76**) kann zudem mit tertiären Alkoholen über ein Chlorsulfonylurethan (**VI**) und Decarboxylierung zu Sulfamoylchlorid **77** transformiert werden. Auch die Umsetzung von **76** mit einer Carbonsäure (Ameisensäure) über ein Acylaminosulfonylchlorid (**VII**) und anschließender Decarboxylierung/Decarbonylierung zu **78** ist möglich (**Schema 7**).<sup>[359,364]</sup>

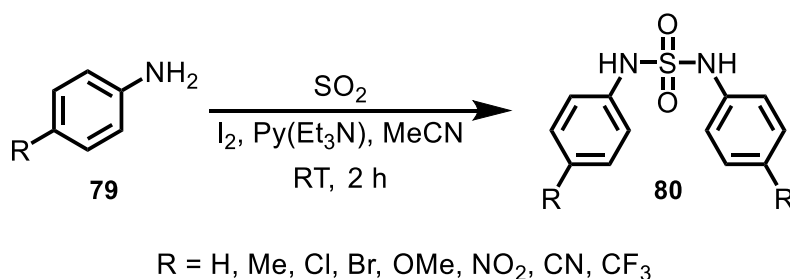


**Schema 7:** Darstellung von Sulfamoylchlorid aus Chlorsulfonylisocyanat

Allerdings liefern diese Methoden aufgrund ihrer harschen Reaktionsbedingungen in der Regel lediglich moderate Ausbeuten. Ferner kann bei der Synthese von Sulfamoylchlorid ausgehend von Sulfurylchlorid eine zweifache Aminierung und im Falle der Verwendung von primären

Aminen auch die Bildung von Alkylimidobisschwefelsäurediamiden selbst bei tiefen Temperaturen und sorgfältigem präparativen Arbeiten nicht völlig ausgeschlossen werden.<sup>[353]</sup>

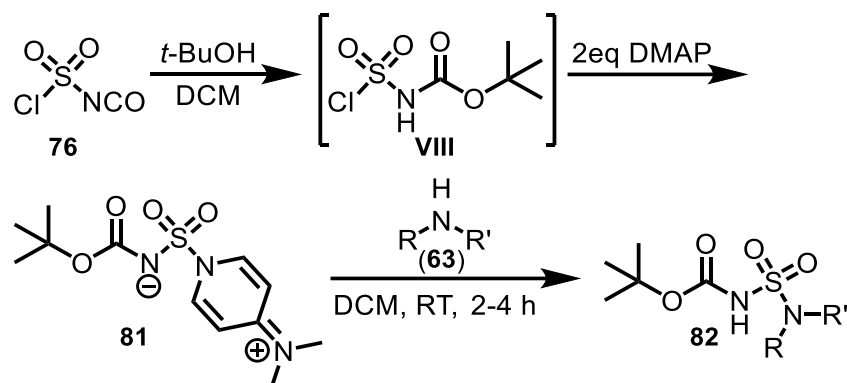
Ein weiteres Beispiel für die Darstellung symmetrischer Schwefelsäurediamide (**80**) stellt die Umsetzung von Anilinderivaten (**79**) mit gasförmigem Schwefeldioxid dar (**Schema 8**).<sup>[365]</sup> Bei dieser Reaktion bildet die Aminbase Pyridin (oder Triethylamin) Donor-Akzeptor-Komplexe mit Iod wie  $\text{Py}\cdot\text{I}^+\text{I}^-$  und  $\text{Py}\cdot\text{I}^+\text{I}_3^-$  sowie  $\text{Py}^+\cdot\text{SO}_2^-$  mit Schwefeldioxid.<sup>[366–369]</sup> Diese Komplexe reagieren im Weiteren miteinander und führen so zur Bildung von Iodsufinat ( $\text{SO}_2\text{I}^-$ ) und dem reaktiven Sulfuryliodid ( $\text{SO}_2\text{I}_2$ ), das letztlich mit den Anilinderivaten eine nucleophile Substitutionsreaktion eingeht.<sup>[370]</sup> Dabei werden sowohl elektronenziehende als auch elektronenschiebende Gruppen toleriert.



**Schema 8:** Darstellung von symmetrischen Schwefelsäurediamiden mit Schwefeldioxid

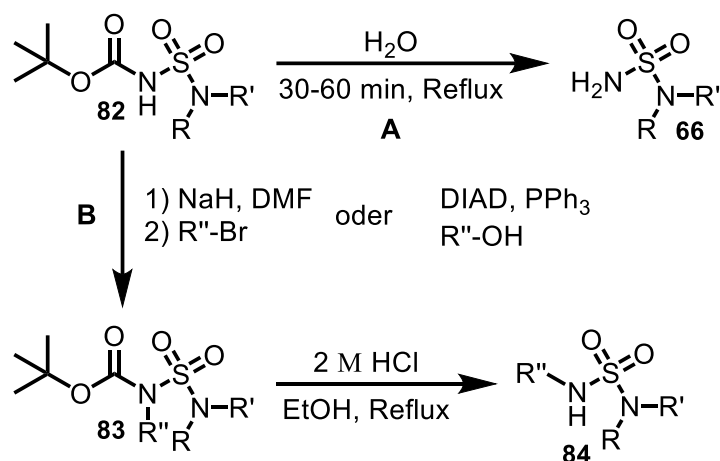
### Moderne Synthese-Verfahren

Eine andere Synthesemöglichkeit zur Darstellung von Schwefelsäurediamiden stellt die Sulfamoylierung von Aminen mittels *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N'*-[4-(dimethylazaniumyliden)-1,4-dihydropyridin-1-ylsulfonyl]azanid (**81**) dar (**Schema 9**). Dieses ist dem *Burgess*-Reagenz, einem sehr milden und *syn*-selektiven Dehydratisierungsreagenz, strukturell sehr ähnlich, das gleichwohl als Zwitterion vorliegt und von NICOLAOU *et al.* zur Synthese fünfgliedriger nichtsymmetrischer, zyklischer Schwefelsäurediamide ausgehend von sekundären  $\beta$ -Aminoalkoholen verwendet wurde.<sup>[371,372]</sup> Nach MONTERO *et al.* kann **81** leicht aus Chlorsulfonylisocyanat (CSI; **76**), *tert*-Butanol und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) erhalten werden. Die Reaktion verläuft dabei über das instabile *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)sulfamoylchlorid (**VIII**) und eignet sich auch zur Festphasensynthese.<sup>[373]</sup> **81** kann sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminen sowie Anilinen unter Bildung von *N*-Sulfamoyl-Carbamaten (**82**) und DMAP als Abgangsgruppe umgesetzt werden.<sup>[374]</sup>



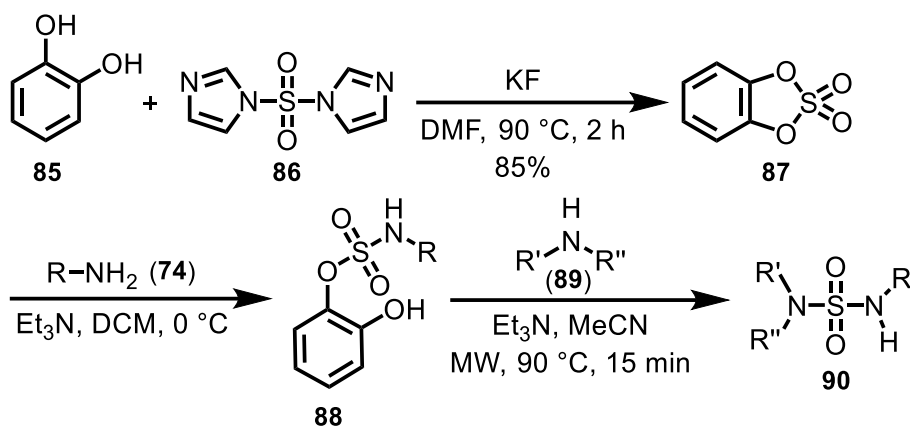
**Schema 9:** Moderne Syntheseveriante zur Darstellung von Schwefelsäurediamiden durch Sulfamoylierung von Aminen nach MONTERO *et al.* mittels eines *Burgess*-artigen Reagenz

Die *N*-Sulfamoyl-Carbamate (82) lassen sich im Folgenden entschützen und durch Spaltung der entsprechenden Carbamidsäuren in die primären/sekundären Schwefelsäurediamide 66+84 überführen (**Schema 10**).<sup>[375,376]</sup> Vor der säurekatalysierten Entschützung und Decarboxylierung kann 82 unter basischen Bedingungen mit Natriumhydrid deprotoniert und mit einem als Elektrophil wirkenden Bromid oder mit einem Alkohol, Triphenylphosphin (PPh<sub>3</sub>) und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) in einer *Mitsunobu*-Reaktion funktionalisiert werden.<sup>[314,377]</sup> Diese Ansätze bieten Zugang zu unsymmetrischen, tertiären Schwefelsäurediamiden (84).



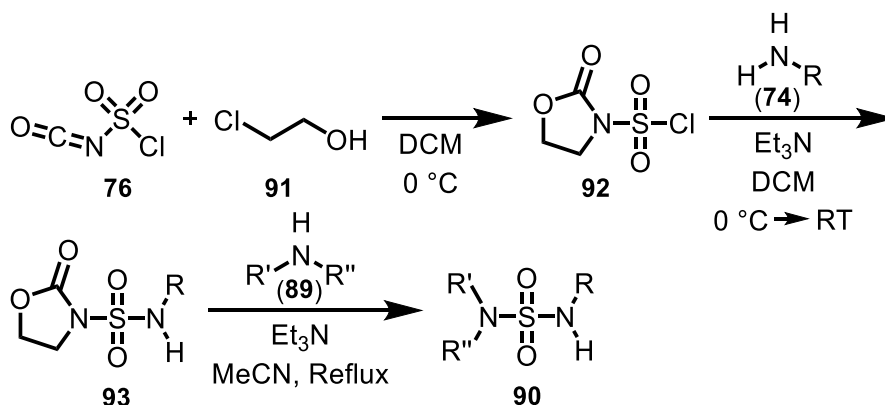
**Schema 10:** Funktionalisierung von *N*-Sulfamoyl-Carbamaten

DUBOIS *et al.* haben eine weitere effiziente Methode zur Darstellung unsymmetrischer Schwefelsäurediamide entwickelt (**Schema 11**), die vom zyklischem Catecholsulfat (87) ausgeht.<sup>[378,379]</sup> Dieses kann leicht aus Catechol (85) und Sulfonylbisimidazol (86) dargestellt werden.<sup>[380]</sup> 87 reagiert hierbei zunächst unter Ringöffnung mit einem Amin (74) zum Sulfamatester 88. Insbesondere primäre, aliphatische Amine eignen sich für jene Reaktion. Der Sulfamatester 88 kann dann mit einem weiteren Amin (89) Mikrowellen-assistiert zum entsprechend unsymmetrischen Schwefelsäurediamid 90 umgesetzt werden.<sup>[377,381]</sup>



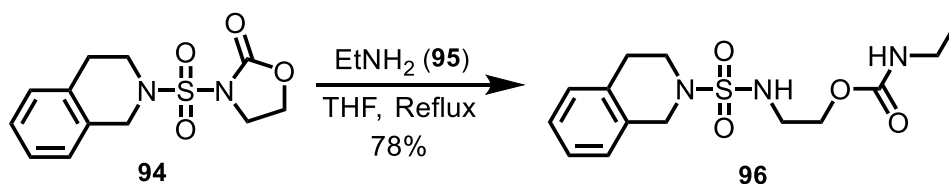
**Schema 11:** Moderne Synthesevariante zur Darstellung von Schwefelsäurediamiden nach DUBOIS *et al.* ausgehend vom zyklischen Catecholsulfat

Weiterhin lassen sich unsymmetrische Schwefelsäurediamide mittels *N*-Sulfamoyloxazolidinon (93) als transsulfamoylierendem Agens darstellen (**Schema 12**).<sup>[382,383]</sup> 93 ist hierbei aus Chlorsulfonylisocyanat (CSI; 76) und 2-Chlorethanol (91) über das Chlorsulfonyloxazolidinon 92 zugänglich.<sup>[384]</sup>



**Schema 12:** Moderne Synthesevariante zur Darstellung von Schwefelsäurediamiden nach MONTERO *et al.* ausgehend von *N*-Sulfamoyloxazolidinon

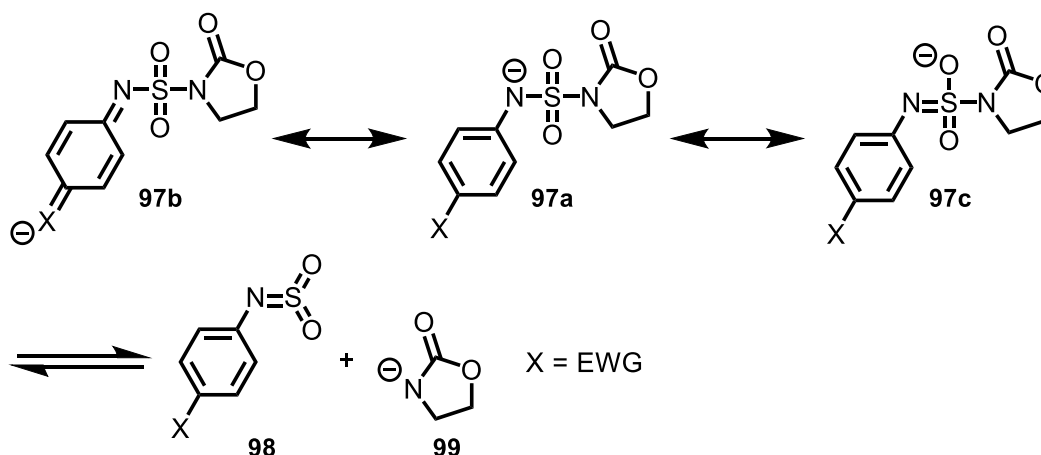
Wie BEAUDION *et al.* zeigen konnten, lässt sich diese Methode nicht uneingeschränkt nutzen (**Schema 13**). Während bei der Umsetzung von Sulfamoyl-*N*-oxazolidinon 94 mit Anilinen keine Reaktion eintrat, kam es bei der Umsetzung mit Ethylamin (95) nicht zur Substitution der Oxazolidinon-Gruppe, sondern zum nucleophilen Angriff auf den Oxazolidinon-Ring und zur Bildung des Carbamats 96.<sup>[385]</sup>



**Schema 13:** Mögliche Nebenreaktion bei der Umsetzung von Sulfamoyl-*N*-oxazolidinonen mit primären Aminen

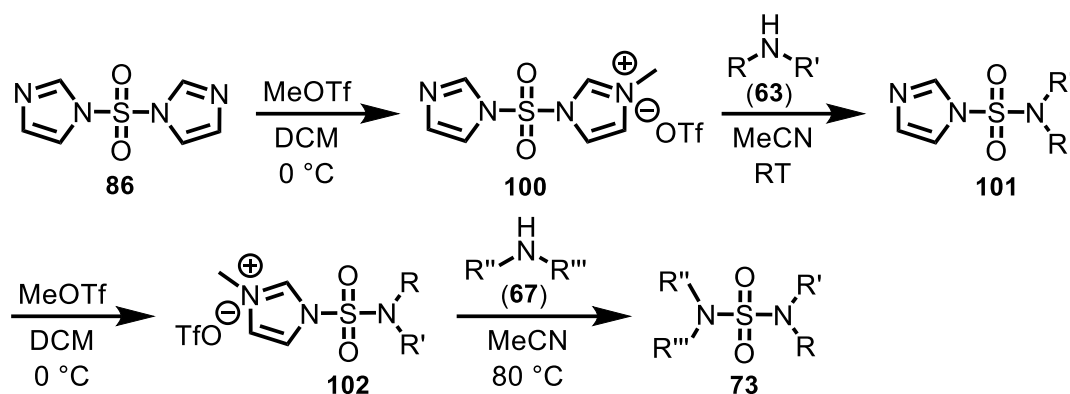


Somit bringt jene Reaktionssequenz ein Chemoselektivitätsproblem mit sich. Auch in anderen Fällen wurde die Bildung unerwünschter Nebenprodukte beobachtet.<sup>[386]</sup> Vermutlich verläuft die Reaktion des *N*-Sulfamoyloxazolidinons mit einem Amin unter Basenkatalyse über einen Eliminationsmechanismus (E1cB).<sup>[382]</sup> Dabei entsteht nach Deprotonierung zunächst die sehr elektrophile *N*-Sulfonylamin-Spezies (RN=SO<sub>2</sub>), wie bereits von DEWYNTER vermutet wurde.<sup>[387–390]</sup> Diese wird auch bei der Reaktion von Sulfamoylchloriden mit Aminen oder der Aminolyse/Hydrolyse von Sulfatestern gebildet.<sup>[391,392]</sup> Somit kommen ausschließlich primäre Amine zur Bildung des *N*-Sulfamoyloxazolidinons **93** in Frage. Jener Sachverhalt lässt sich auch als Erklärung dafür nutzen, warum insbesondere aromatische Amine mit elektronenziehenden Gruppen keine Reaktion eingehen. Das Oxazolidinon verliert demnach seine transsulfamylierende Reaktivität durch die besonders gute Mesomeriestabilisierung des gebildeten Carbanions **97a** (Schema 14).<sup>[382]</sup>



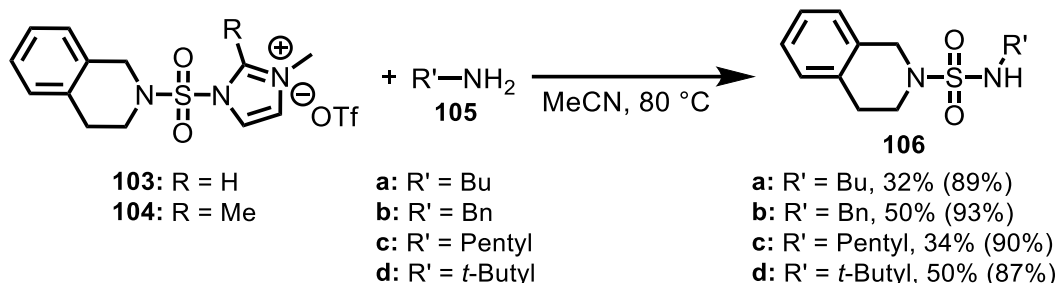
**Schema 14:** Ausgewählte mesomere Grenzformeln bei der Bildung der *N*-Sulfonylamin-Spezies **98**

Auch *N,N'*-Sulfurylimidazole (**86**) bieten eine effiziente Möglichkeit zur Synthese von Schwefelsäurediamiden (Schema 15). Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich das Imidazol durch Methylierung in eine gute Abgangsgruppe überführen lässt. Demnach führt die sequentielle Aktivierung beider Imidazole (**100+102**) jeweils gefolgt von einer Substitutionsreaktion mit einem Amin oder einem Anilin, letztlich zu einem unsymmetrischen Schwefelsäurediamid (**73**).<sup>[385,393,394]</sup>



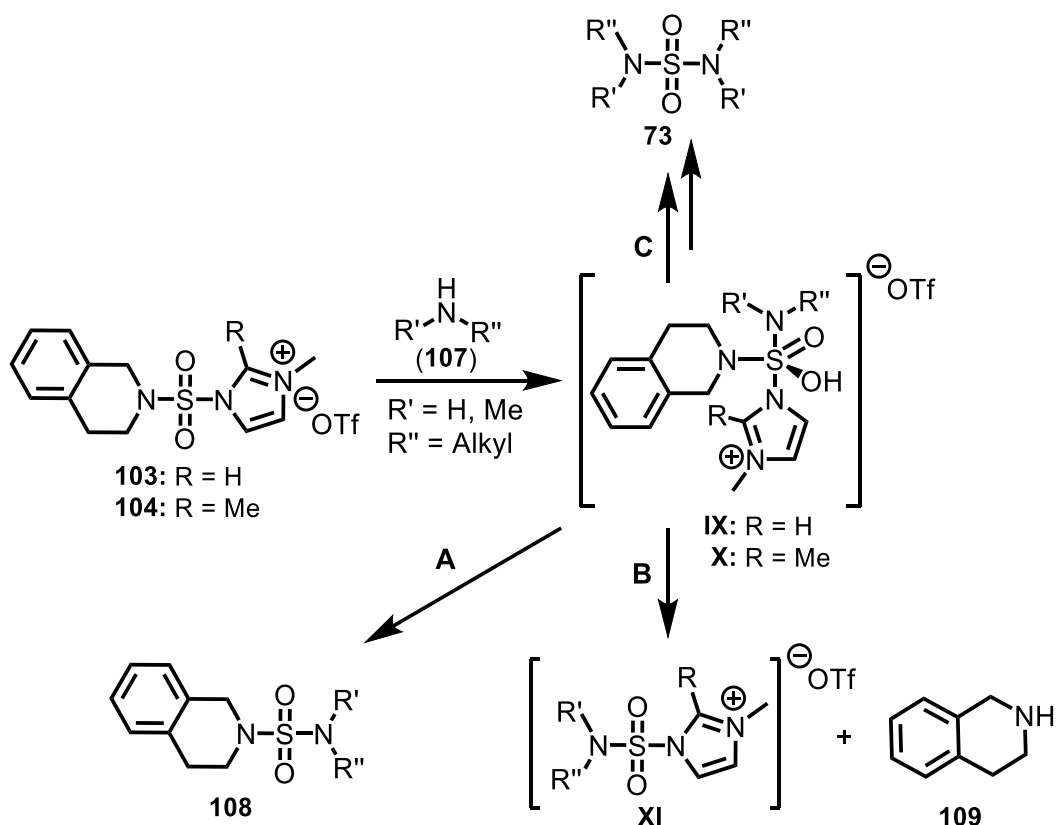
**Schema 15:** Moderne Synthesemethode zur Darstellung von Schwefelsäurediamiden nach BEAUDION *et al.* ausgehend von *N,N'*-Sulfurylimidazol (**86**)

Diese Methode eignet sich jedoch nur, wenn von sekundären Aminen ausgegangen wird. Wie BEAUDION *et al.* berichten, führt die Reaktion des 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-Derivats **103** mit den weniger nucleophilen primären Aminen (**105a-d**) nur zu schlechten bis lediglich moderaten Ausbeuten (**Schema 16**).<sup>[385]</sup>



**Schema 16:** Vergleich der Ausbeuten bei der Synthese von Schwefelsäurediamiden ausgehend von den (un)methylierten Imidazoliumsalzen **103+104** (die Ausbeuten in den Klammern entsprechen den Ausbeuten der Reaktion der Amine **105** mit dem methylierten Imidazoliumsalz **104**)

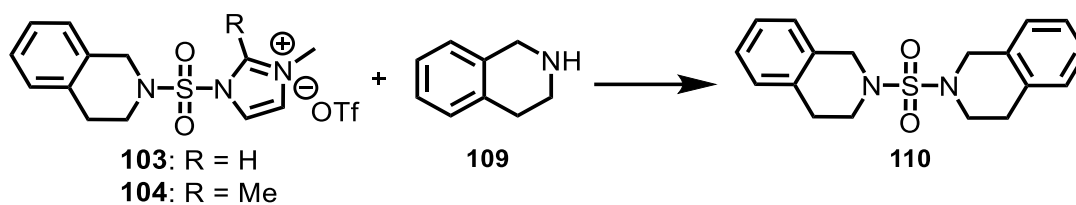
Unter Verwendung des entsprechend methylierten Sulfurylimidazols **104** konnten indessen bei sonst identischen Reaktionsbedingungen die Schwefelsäurediamide **106a-d** in jeweils guten Ausbeuten erhalten werden. Um die erhöhte Reaktivität der methylierten Spezies zu erklären, haben BEAUDION *et al.* folgenden Additions-Eliminierungs-Mechanismus postuliert (**Schema 17; A**).<sup>[385]</sup>



**Schema 17:** Postulierter Additions-Eliminierungs-Mechanismus der Imidazoliums Salze

Das Amin **107** greift das Imidazoliumsalz (**103+104**) demnach unter Bildung der bipyramidalen Intermediate **IX+X** an. Die Methylgruppe in 2-Position des Imidazolrings erhöht hierbei dessen sterischen Anspruch um das zentrale Schwefelatom von Intermediat **X**. Dadurch sinkt zugleich die Stabilität des gesamten Komplexes, woraufhin dieser schneller zum gewünschten Produkt **108** zerfällt. Auch sterisch anspruchsvolle Amine selbst haben einen solchen Effekt. So konnten BEAUDION *et al.* mit *N*-Methyl-*tert*-butylamin via LC-MS-Analyse im Zuge der Reaktion beispielsweise nicht die Bildung des Intermediats **IX** nachweisen, was ihnen mit anderen Substraten hingegen gelang.

Nimmt die Stabilität des Intermediats **IX** zu, so wächst auch die Wahrscheinlichkeit, dass eine andere Gruppe als der zwischenzeitlich positiv geladene Imidazolring eliminiert wird (**Schema 17; B**). So entsteht bei der Reaktion durch Eliminierung von Tetrahydroisochinolin (**109**) zugleich ein weiteres reaktives Intermediat (**XI**). Das Tetrahydroisochinolin (**109**) kann im Weiteren nun als Nucleophil ebenfalls die aktivierte Ausgangsverbindung angreifen, was zur Bildung des symmetrischen Schwefelsäurediamids **110** führt (**Schema 18**). Dieses konnte von BEAUDION *et al.* als Nebenprodukt der Reaktion tatsächlich massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Das andere denkbare symmetrische Reaktionsprodukt **73**, welches sich nach Reaktion von **XI** mit **107** gemäß **Schema 17 (C)** ergibt, wurde hingegen nicht beobachtet.

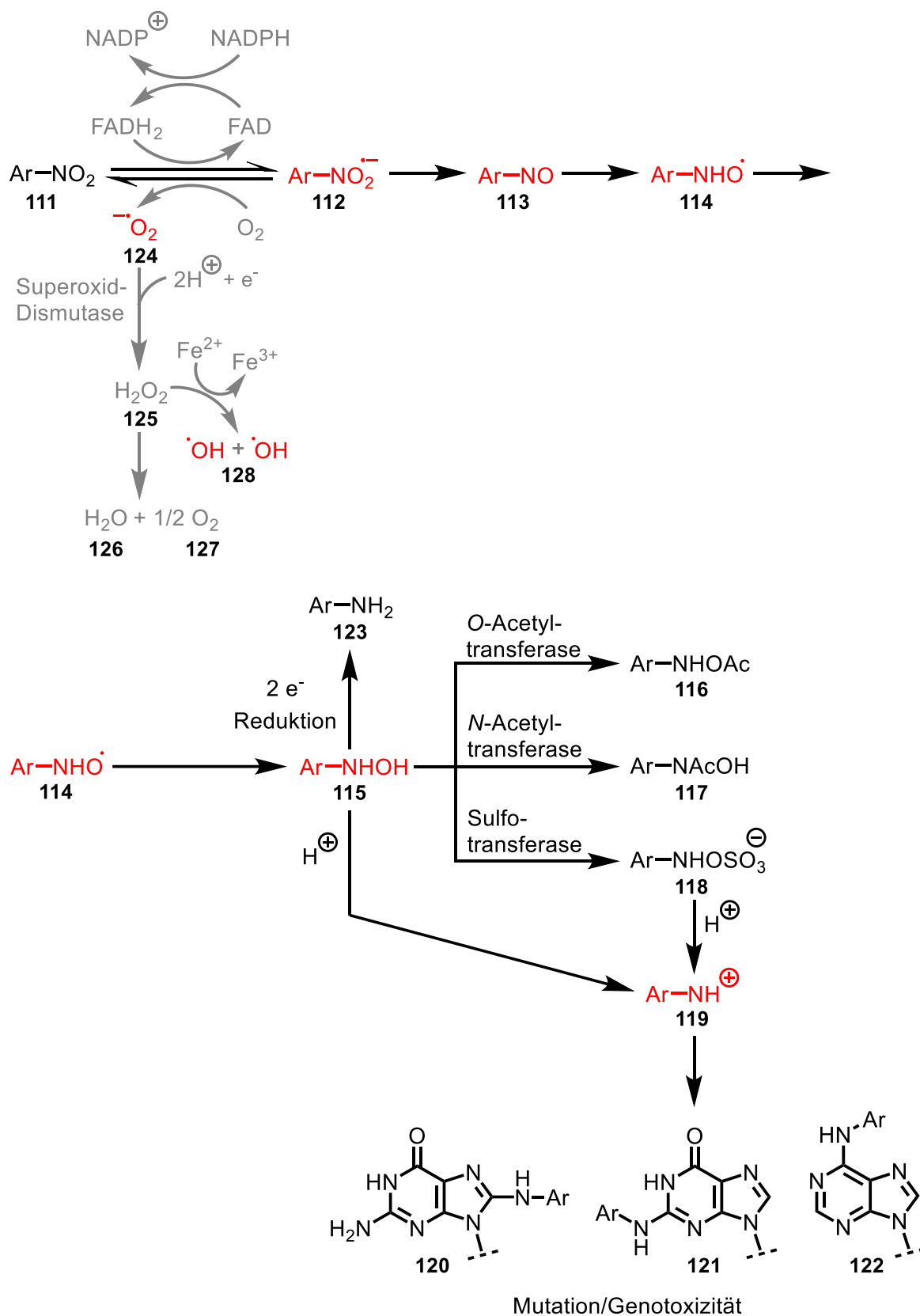


**Schema 18:** Mögliches Nebenprodukt bei der Reaktion der Imidazoliumsalze

### 1.3 Die Nitro-Gruppe in der Medizinalchemie – Eigenschaften und Nitro-Drugs

Die Nitro-Gruppe ist eine einzigartige, vielseitige funktionelle Gruppe in der Medizinalchemie mit wichtigen physikochemischen sowie pharmakologischen Eigenschaften. Sie besitzt einen starken Elektronenzug, der ein Molekül elektronenarm macht und so eine Interaktion mit biologischen Nucleophilen wie Proteinen, Enzymen, Aminosäuren und Nukleinsäuren ermöglicht. Die Wechselwirkung kann dabei als nucleophile Addition oder als Elektronentransfer über eine Oxidation und Reduktion erfolgen. Auch sind eine Charge-Transfer-Wechselwirkung, die Komplexierung eines Moleküls sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen denkbar. Der elektronische Einfluss der Nitro-Gruppe wirkt sich zudem auf den Wert der Säurekonstante  $pK_s$  eines Moleküls sowie dessen Polarisierbarkeit aus. Neben den elektronischen und sterischen Effekten hat die Nitro-Gruppe weiterhin entscheidenden Einfluss auf die Lipophilie und damit die Wasserlöslichkeit.

In biologischen Systemen erfahren Nitro-Verbindungen (**111**) eine enzymatische Reduktion, die von Nitroreduktasen vermittelt wird (**Schema 19**).<sup>[395–397]</sup> Diese verwenden Flavin-Mononucleotid (FMN) bzw. Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) bzw. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als reduzierendes Agens. Vereinfacht beinhaltet der bioreduktive Pfad die Bildung eines Nitro-Radikal-Anions (**112**), eines Nitroso-Derivats (**113**), eines Nitroxyl-Radikals (**114**) sowie von Hydroxylamin (**115**) jeweils durch einmalige Ein-Elektronenübertragung. Hydroxylamin **115** kann schließlich durch zweimalige Ein-Elektronenübertragung zum primären Amin **123** reduziert werden. Ebenso ist eine Phase II-Konjugations-Reaktion mit Acetyl-CoA zum *O*-Acylester **116** sowie zur Hydroxamsäure **117** oder mit 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat zum Schwefelsäuremonoester **115** möglich. Unter sauren Bedingungen zerfallen diese wie auch das Hydroxylamin (**115**) zu Nitrenium-Ionen (**119**), die schließlich kovalente Addukte (**120-122**) unter anderem mit der DNA-Base Guanin bilden. Auch die hochreaktiven Intermediate, angefangen beim Nitro-Radikal-Anion **112** bis zum Hydroxylamin **115**, sind zur Reaktion mit Biomolekülen befähigt. Während das Hydroxylamin vor allem mit einer erhöhten Konzentration von Methämoglobin im Blut und somit einem verminderten Sauerstofftransport in Verbindung gebracht wird, sind die anderen Intermediate im Kontext mit mutagenen und karzinogenen Eigenschaften zu nennen.<sup>[398,399]</sup>



**Schema 19:** Reaktionspfad der Verstoffwechslung von Nitroarenen (modifiziert nach NEPALI *et al.* und CHUNG *et al.*)<sup>[400,401]</sup>

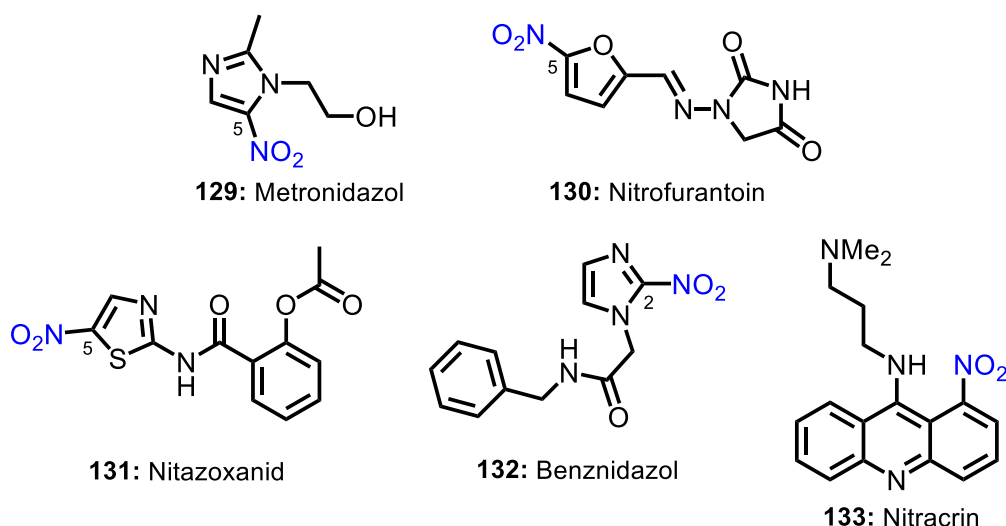
In aerober Umgebung reagiert das gebildete Nitro-Radikal-Anion **112** zudem mit einem Sauerstoffmolekül unter Bildung eines Superoxid-Anions (**124**). Dieses wiederum wird durch

die Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid (**125**) überführt, das seinerseits membranschädigend ist und durch Ferredoxin zu Hydroxylradikalen (**128**) umgesetzt wird.<sup>[402,403]</sup>

Die Tatsache, dass Nitro-Gruppen im Zuge der Biotransformation hochreaktive Intermediate bilden, die mit Biomolekülen wiederum nachteilig wechselwirken können, macht sie zu sogenannten *structural alerts* oder auch Toxikophoren.<sup>[404,405]</sup> Diese sind oftmals der Grund, warum Moleküle, die eine NO<sub>2</sub>-Gruppe tragen, in weiteren Entwicklungsstadien eines Wirkstoffes nicht weiterverfolgt werden und damit unbeachtet bleiben. Versuche, Nitro-Gruppen in einer biologisch aktiven Verbindung frühzeitig adäquat zu ersetzen und damit zu verdrängen, sind daher sinnvoll. Andererseits muss sich die Nitro-Gruppe in einem Molekül nicht zwangsläufig negativ auswirken. Oftmals ist sie als *Prodrug* auch der Grund für die Wirksamkeit in biologischen Systemen und damit ein Pharmakophor. Nachfolgend werden einige Beispiele für bedeutende Wirkstoffe, die eine Nitro-Gruppe tragen und unterschiedlichsten Indikationsgebieten angehören, aufgeführt. Diese besitzen verschiedenartige Mechanismen der Aktivierung. Eine Biotransformation kann in einzelnen Fällen eine Aktivierung bedeuten, ist aber nicht immer erforderlich. So sind auch Beispiele bekannt, bei denen die bioreduktive Transformation irrelevant für die Wirkung ist und diese vielmehr auf den elektronischen bzw. den andersartigen physiko-chemischen Eigenschaften der Nitro-Gruppe beruht. Ebenso kann es sein, dass ein direkter Einfluss der Nitro-Gruppe nicht zu erkennen ist. Ferner kann die Biotransformation auch zur Inaktivierung einer zuvor aktiven Verbindung führen oder für dessen Nebenwirkungen verantwortlich sein.

Bedeutende Gruppen von bakteriostatisch beziehungsweise bakterizid sowie antiparasitär (vgl. Niridazol (**5**) und Furapromidium (**6**); **Abb. 4**, S. 9) wirksamen Antibiotika, deren Wirkung auf der Aktivierung einer Nitro-Gruppe zu hoch wirksamen, die DNA angreifenden Metaboliten beruht, sind die 5-Nitrofuran- und 5-Nitroimidazol-Derivate. Sie werden zur Behandlung von Infektionen mit anaeroben Bakterien und Protozoen eingesetzt.<sup>[400,406–408]</sup> Die enzymatische Reduktion der Nitrogruppe erfolgt durch spezielle Nitroreduktasen der Anaerobier, während diese in menschlichen Zellen durch den vorwiegend oxidativen Stoffwechsel und die geringe Nitroreduktase-Aktivität nur in sehr geringem Umfang erfolgt. Die DNA-Schäden, die letztlich zur Hemmung der DNA-Synthese und damit zum Zelltod führen, können sich in Form von Verlusten der helikalen Struktur, Beeinträchtigung der Matrizenfunktion oder Strang-Brüchen äußern.<sup>[409]</sup> Beispiele stellen das Metronidazol (**129**) und Nitrofurantoin (**130**) dar (**Abb. 26**). Zusätzlich antivirale Wirkung besitzen 5-Nitrothiazol-Derivate wie Nitazoxanid (**131**). Es hemmt die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR),

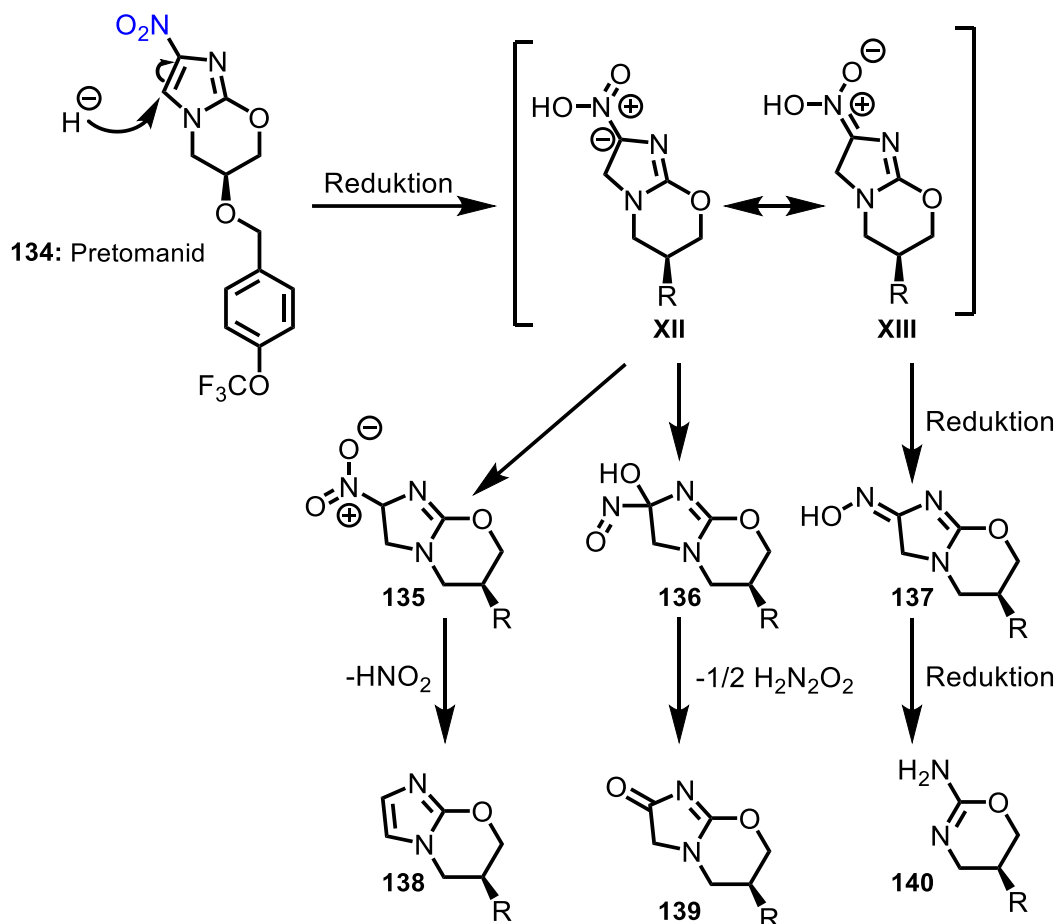
welche die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetat katalysiert.<sup>[410,411]</sup> Ausschließlich gegen Protozoen gerichtet sind indessen 2-Nitroimidazol-Derivate wie Benznidazol (**132**) zur Behandlung der *Chagas*-Krankheit.<sup>[412]</sup> Auch im Bereich der Krebstherapie gibt es weitere Beispiele für Wirkstoffe mit Nitro-Gruppen wie das Nitracrin (**133**), ein Acridin-Derivat, das stark zytotoxisch gegenüber den meisten Zellen ist. Es hemmt die RNA-Synthese und wird gegen Brust- und Eierstock-Krebs eingesetzt. Die Wirkung beruht auch hier auf der Reduktion der Nitro-Gruppe und der reversiblen Bindung an die DNA.<sup>[413]</sup>



**Abbildung 26:** Nitro-Verbindungen, deren Metabolite in die DNA interkalieren

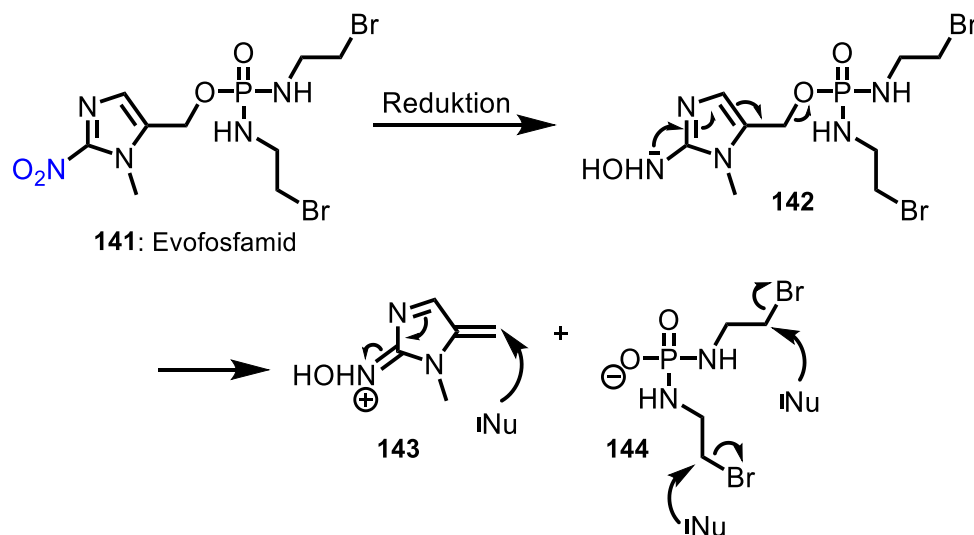
Pretomanid (**134**), ein bicyclisches Nitroimidazol mit *s*-Konfiguration, ist ein Antibiotikum, das seit 2019 von der FDA (*food and drug administration*) zur Behandlung der Tuberkulose zugelassen ist.<sup>[414]</sup> Es stellt ein *Prodrug* dar und wird durch eine Nitroreduktase des Tuberkelbazillus aktiviert (**Schema 20**).<sup>[415]</sup> Dabei entsteht nach initialer Hydrid-Addition am C-3-Atom des Nitroimidazol-Bicyclus von **134** ein instabiles Intermediat (**XII+XIII**), welches resonanzstabilisiert ist und Zugang zu drei unterschiedlichen Produkten ermöglicht. Protonierung der C-2-Position und anschließende Eliminierung von salpetriger Säure führt zu *des*-Nitroimidazol **138**. Im Zuge einer enzymatischen *Nef*-Reaktion wird nach Hydrolyse neben **139** zudem schließlich hyposalpetrige Säure freigesetzt. Außerdem hat die weitere Reduktion von **137** die Bildung eines instabilen Hydroxylamin-Derivats zur Folge, das zu **140** zerfällt. Die als Nebenprodukte entstandenen reaktiven Stickstoff-Spezies, insbesondere die salpetrige Säure, reagieren zu Stickstoffmonoxid, das gegenüber Bakterien toxisch ist. Das R-Enantiomer von **134** wiederum ist gegen den Erreger der Leishmaniose aktiv.<sup>[416]</sup>





**Schema 20:** Mechanismus der Aktivierung von Pretomanid<sup>[415]</sup>

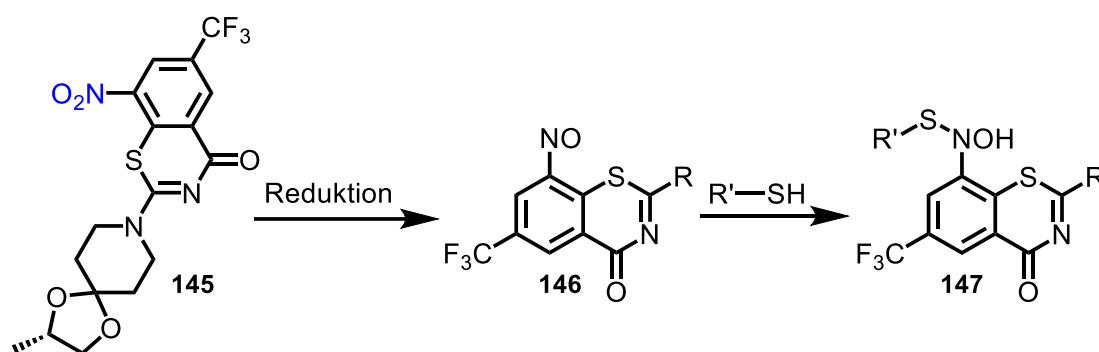
Evofosfamid (**141**) ist ein anderes Beispiel für ein Nitroimidazol-basiertes *Prodrug* zur Behandlung von Pankreaskrebs. Es wird nur bei sehr geringen Sauerstoffgehalten aktiviert (**Schema 21**).<sup>[417,418]</sup> Gewebereiche mit niedriger Sauerstoffkonzentration (Hypoxie) kommen bei soliden Tumoren aufgrund unzureichenden Wachstums von Blutgefäßen vor.



**Schema 21:** Mechanismus der Aktivierung von Evofosfamid

Die Wirkung beruht auf der Vernetzung (*cross-linking*) der DNA. Es ist ein Entwicklungskandidat, der allerdings in der klinischen Phase III scheiterte.<sup>[419]</sup>

Ein anderer gegen die Tuberkulose gerichteter Wirkstoff (**145**), welcher am LEIBNIZ-Institut in Jena entwickelt wurde und ein Benzothiazinon-Derivat darstellt, befindet sich derzeit in der klinischen Phase II. Er wirkt als *Prodrug* und hemmt die Decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-Ribose-Oxidase (DprE1), ein essenzielles Flavoenzym der Zellwandsynthese von *M. tuberculosis*.<sup>[420,421]</sup> Nach Reduktion der Nitro- zur Nitroso-Gruppe (**146**) geht diese eine kovalente Bindung mit der Thiolgruppe eines Cysteins von DprE1 ein und es entsteht **147** (Schema 22).



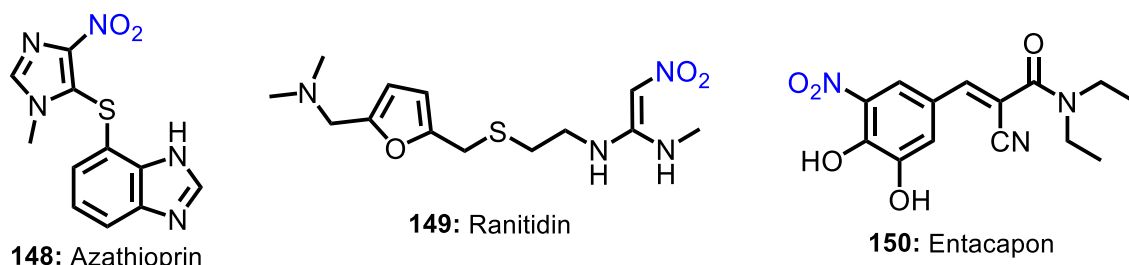
Schema 22: Mechanismus der Aktivierung des Benzothiazinon-Derivats **145**<sup>[421]</sup>

Nicht immer dient die Nitro-Gruppe als Pharmakophor. Auch die physiko-chemischen Eigenschaften können in der Medizinalchemie von Nutzen sein (Abb. 27). Bei Azathioprin (**148**), einem Immunsuppressivum, das beispielsweise zur Verhütung von Transplantatabstoßungen dient und die Nukleinsäuresynthese hemmt, wird durch den Nitroimidazol-Rest nicht dessen eigentliche Wirkung hervorgerufen. Vielmehr dient jener Rest zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit und damit zu einer besseren Resorption. Der Thioether wird anschließend durch Glutathionylat gespalten, es entsteht das 6-Mercaptopurin, der aktive Hauptmetabolit.<sup>[422,423]</sup> Der starke Elektronenzug der Nitrogruppe erleichtert dabei den nucleophilen Angriff auf das elektrophile Kohlenstoffatom des Imidazol-Ringes.

Ranitidin (**149**) ist das Produkt der Weiterentwicklung eines Imidazolylalkyl-Thioharnstoff-Derivats. Es besitzt ein Diaminonitroethen-Strukturelement als bioisosteren Ersatz eines polaren Cyanoguanidin-Restes, der zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt ist und die Thioharnstoffgruppe ersetzt. Als Antagonist des Histamin- $H_2$ -Rezeptors hemmt es die Histamin-stimulierte Sekretion von Salzsäure und Pepsin im Magen und wird unter anderem bei Sodbrennen, saurem Aufstoßen, Magen- und Darmgeschwüren eingesetzt.<sup>[424-426]</sup> Im April 2020 hat die FDA für alle Ranitidin-haltigen Arzneimittel eine

Markrücknahme angeordnet, da diese geringe Mengen des als möglicherweise krebserregend eingestuften *N*-Nitrosodimethylamin als Verunreinigung enthalten können.<sup>[427]</sup>

Entacapon (**150**) ist ein Inhibitor der Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) zur Behandlung von Parkinson.<sup>[428]</sup> Es wird in Kombination mit Levodopa, einem *Prodrug* des Neurotransmitters Dopamin, und einem Decarboxylasehemmer verabreicht. Die Funktion von COMT besteht in der Inaktivierung biologisch aktiver Catechol-Derivate durch einen Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf das Substratmolekül. Es nimmt damit eine Schlüsselrolle im Metabolismus von Levodopa ein.<sup>[429–431]</sup> Die COMT-Hemmung unterbindet diesen Metabolisierungsschritt und ermöglicht so eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit und eine Verbesserung der peripheren Levodopa-Pharmakokinetik. Dies hat zur Folge, dass im zentralen Nervensystem mehr Dopamin aus Levodopa gebildet wird und die dopaminerge Stimulation anhaltender ist. Die nitrierte Catecholgruppe ist für die Bindung des Inhibitors an das Enzymmolekül essenziell und ragt tief in das aktive Zentrum des Enzyms. Dabei wird sie unter anderem durch Wasserstoffbrückenbindungen zur Nitrogruppe fixiert.<sup>[431,432]</sup>



**Abbildung 27:** Nitro-Verbindungen, bei denen weitere physiko-chemische Eigenschaften der Nitro-Gruppe neben dem Elektronenzug für die Wirkung entscheidend sind

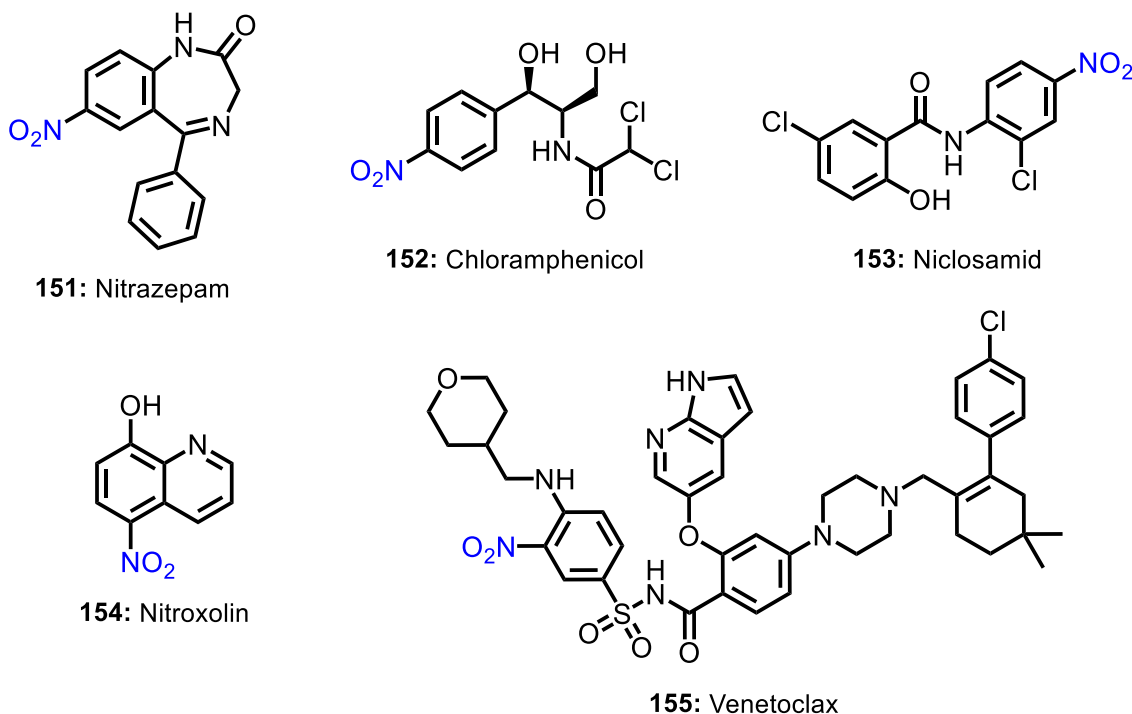
Im Folgenden werden nun Beispiele von Wirkstoffen aufgeführt, bei denen die Nitrogruppe ohne „direkten Vorteil“ zu sein scheint, aber dennoch geduldet wird (**Abb. 28**). Zu nennen sind in diesem Zusammenhang Benzodiazepine, also 1,4-Benzodiazepin-2-on-Derivaten, zu denen auch das Nitrazepam (**151**) gehört. Sie werden unter anderem gegen Angst-, Erregungs- und Spannungszustände, aber auch gegen Schlafstörungen und Epilepsie eingesetzt. Der Effekt beruht auf der Verstärkung der Wirkungen des hemmenden Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Gehirn. Hervorgerufen wird der Effekt durch die allosterische Bindung an den postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, einem Chlorid-Ionenkanal. Die Bindung hat eine Änderung der Rezeptorgestalt zur Folge, sodass es im Weiteren zu einer erhöhten Affinität von GABA an seine orthosterische Bindungsstelle und damit zu einem erhöhten Einstrom von Cl<sup>-</sup>-Ionen in

die Nervenzelle kommt.<sup>[433]</sup> Es ist bekannt, dass die Metabolisierungsprodukte der Nitro-Gruppe von Nitrazepam schwerwiegende Leberschäden verursachen können.<sup>[434]</sup>

Auch Chloramphenicol (**152**) ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Antibiotika, der aufgrund seines ungünstigen Nebenwirkungsprofils, das auf die Reduktion der Nitro-Gruppe zurückzuführen ist, heute nur noch zur Behandlung von schweren, sonst nicht zu beherrschenden Infektionskrankheiten wie Typhus, Diphtherie und Ruhr verwendet wird.<sup>[435]</sup>

Es wirkt durch reversible Bindung an das katalytische Zentrum der 50S-Unterheit der bakteriellen Ribosomen, wodurch die Verlängerung der Peptidkette blockiert wird.<sup>[436,437]</sup>

Unter den anthelmintisch wirksamen Verbindungen mit Nitro-Gruppe finden sich neben den in den vorhergehenden Teilen beschriebenen Wirkstoffen Amoscanat (**9**, **Abb. 5**) und Oxamniquin (**17**, **Abb. 6**, S. 10) auch das Salicylsäurederivat Niclosamid (**153**), dessen Wirkung als Molluskizid ebenfalls bereits angedeutet wurde. Es ist heute das Mittel der Wahl gegen Bandwürmer.<sup>[438,439]</sup> Seine Wirkung beruht unter anderem auf der Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und damit der Aufnahme von Glucose in den Parasiten.<sup>[440,441]</sup> Verbunden damit ist der Verlust der Integrität der Membran, wodurch ein Angriff durch Darmenzyme ermöglicht wird.



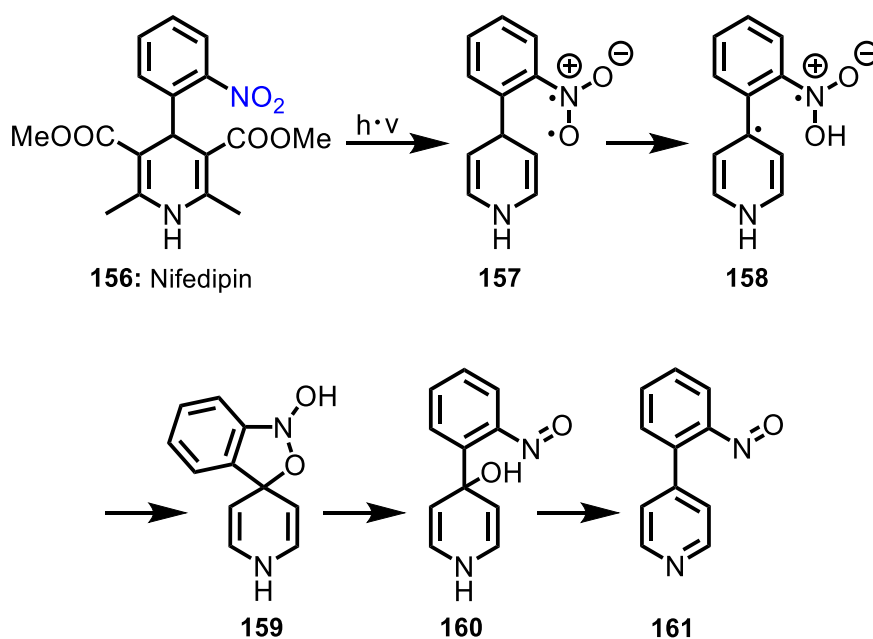
**Abbildung 28:** Nitro-Verbindungen, bei denen ein „direkter Vorteil“ der Nitro-Gruppe nicht erkennbar ist

Nitroxolin (**154**) ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der 8-Hydroxychinolin-Derivate, der als Antibiotikum und Antimykotikum wenn überhaupt in Deutschland Verwendung findet und insbesondere zur Behandlung von akuten und chronischen Infektionen der ableitenden Harnwege eingesetzt wird.<sup>[442]</sup> Der Wirkmechanismus beruht vermutlich auf der Bildung von

Chelaten mit zweiwertigen Ionen, wodurch die Immunzellen Zugang zu den Erregern erlangen.<sup>[443]</sup>

Venetoclax (**155**) ist ein seit 2016 zugelassener antitumoraler und zytotoxischer Wirkstoff zur Behandlung einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). Er hemmt das Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), das bei CLL überexprimiert ist und an der Unterdrückung des natürlichen Vorgangs des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt ist.<sup>[444,445]</sup>

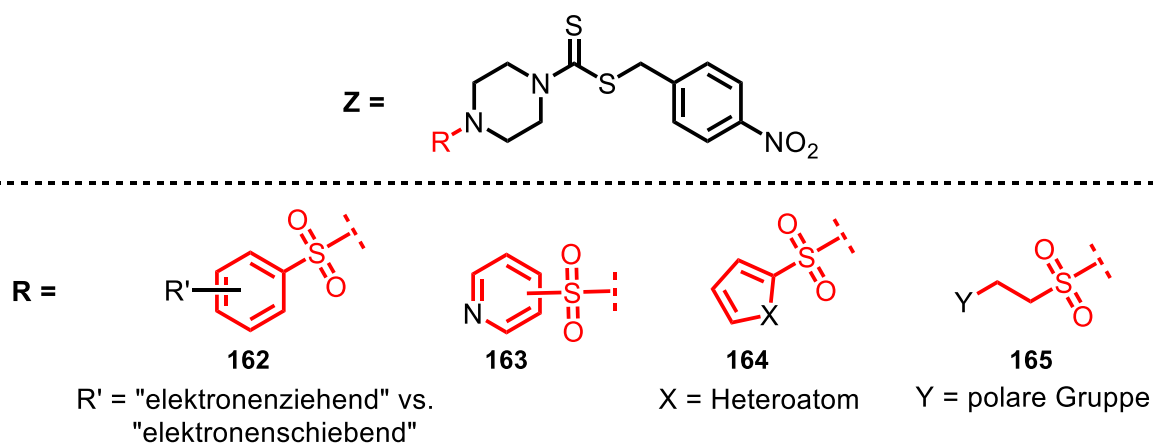
Zu der Klasse von Wirkstoffen mit Nitro-Gruppe gehören auch das Nifedipin (**156**) und seine Derivate. Hierbei handelt es sich um 1,4-Dihydropyridine, die als Calciumantagonisten spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ blockieren und das Einstromen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die glatten Gefäßmuskelzellen hemmen. Sie haben damit blutdrucksenkende und gefäßerweiternde Eigenschaften und werden zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie oder der koronaren Herzkrankheit eingesetzt.<sup>[446,447]</sup> Nifedipin ist stark lichtempfindlich, was letztendlich auf das Vorhandensein der Nitro-Gruppe zurückzuführen ist.<sup>[448]</sup> So wird Nifedipin unter dem Einfluss von Licht durch intramolekulare Disproportionierung in ein 4-(2-Nitrosophenyl)pyridin-Derivat (**161**) umgewandelt, welches therapeutisch unwirksam ist (**Schema 23**). Durch die Rearomatisierung erfolgt der Übergang von der Wannenkonformation in eine planare Anordnung.



**Schema 23:** Mechanismus der Inaktivierung von Nifedipin<sup>[448]</sup>

## 2 Zielsetzung

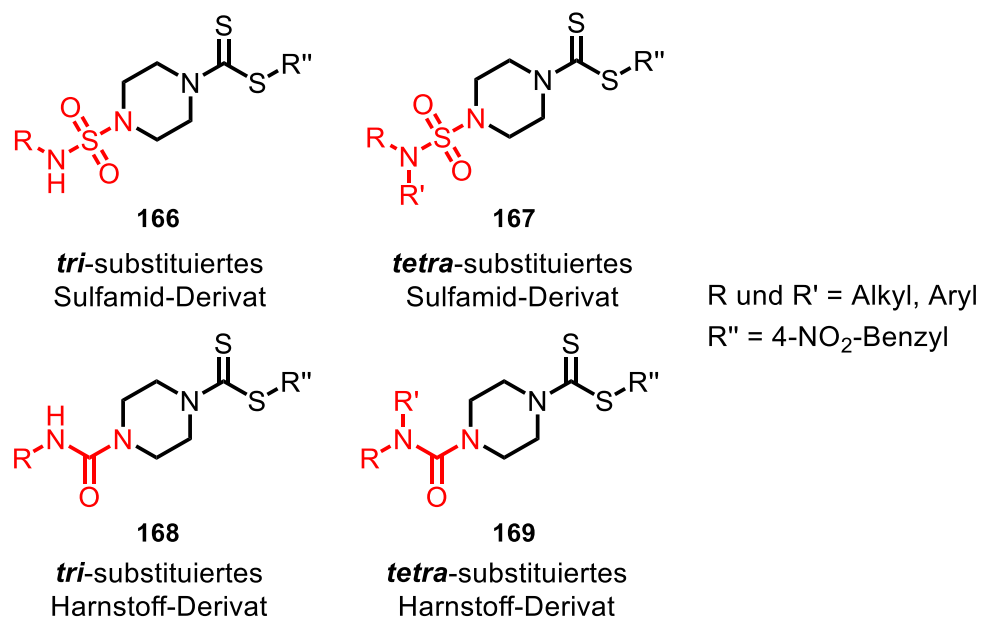
Wird in der Reihe der Dithiocarbamate die Aminogruppe durch einen Sulfonylpiperazinyl-Rest ersetzt gemäß Struktur Z, so zeigte sich die bisher höchste Wirksamkeit bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität. Daher sollte die Weiterentwicklung dieser Derivate als **primäre Entwicklungslinie** betrachtet werden. Auf der Seite des Sulfonylsubstituenten am Piperazin wurden nach vorläufigen SAR (*structure activity relationships*) kleine Alkyl- und Cycloalkylsubstituenten sowie ein Phenylrest sowohl von der Wirkung als auch von der Toxizität her toleriert. Hier ergibt sich ein breites Spektrum an Variationsmöglichkeiten wie etwa die umfassende Substitution am Phenylrest (**162**), der Austausch gegen andere Heterocyklen (**163+164**) sowie die Substitution des Alkylrestes mit kleinen polaren Gruppen (**165**) (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Beispiele für mögliche Optimierungsschritte des Phenylsulfonamid-Derivates und der Alkylsulfonamid-Derivate.

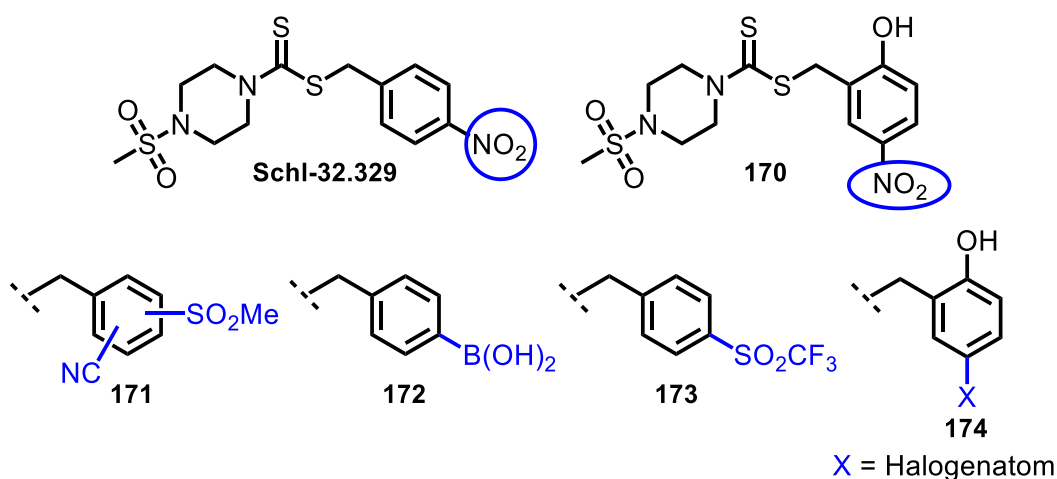
Ebenso galt es, die Synthese von weiteren Schwefelsäurediamid-Derivaten (**166+167**) zu verfolgen. Bisher war nur eine Verbindung ausgehend von Dimethylsulfamoylchlorid mit diesem Strukturelement dargestellt worden, welche im Vergleich zu den Sulfonamid-Derivaten jedoch etwas schwächer wirksam war. Es wurde vermutet, dass sich durch Einführung geeigneter Substituenten die antischistosomale Aktivität im Idealfall steigern ließe. Mit der Einführung eines weiteren Stickstoffatoms ist zudem eine erhöhte Wasserlöslichkeit zu erwarten. Hierfür sollte zunächst eine Syntheseroute für die *bis dato* wenig beschriebene Synthese unsymmetrisch substituierter Schwefelsäurediamide etabliert werden, da Sulfamoylchloride nicht uneingeschränkt kommerziell verfügbar sind und sich nur mit größerem Aufwand sauber darstellen lassen. In der Literatur finden sich nahezu ausschließlich Patentschriften und nur wenige klassische Synthesevorschriften für Sulfamide, die oftmals auch nur unter harschen Reaktionsbedingungen erfolgen und ein breites Substratspektrum nicht tolerieren.

Aufgrund der Tatsache, dass neben den Sulfonylpiperazin-Derivaten auch in der Substanzklasse der Acylpiperazin-Derivate Verbindungen mit guter Wirksamkeit vorhanden waren, erschien es sinnvoll, auch die Substanzklasse der Harnstoffe (**168+169**) hinsichtlich ihrer Wirkung zu untersuchen. Dies ist als **sekundäre Entwicklungslinie** anzusehen. Hier wurden noch keinerlei Anstrengungen hinsichtlich der Synthese und Testung von etwaigen Verbindungen unternommen (**Abb. 30**).



**Abbildung 30:** Grundstruktur der Schwefelsäurediamid- und Harnstoff-Derivate von Dithiocarbamaten

Weiterhin sollte der substituierte *S*-Benzylrest in der Zielverbindung **Z** umfassend variiert werden, mit dem Ziel, die Nitrogruppe in 4-Position der bisher wirksamsten Verbindung (**Schl-32.329**) durch physiologisch verträgliche Reste zu ersetzen. Gute Wirkungen bei akzeptabler Toxizität wurden bereits mit -SO<sub>2</sub>Me und -CN erzielt. Die Kombination dieser Reste in verschiedenen Anordnungen (**171**) war zu eruieren. Von besonderem Interesse waren ferner auch -B(OH)<sub>2</sub> (**172**) und -SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (**173**). Neben dem Ersatz der Nitrogruppe am *para*-Nitrobenzyl-Substituenten durch **171**, **172** und **173** sollte ein Austausch von -NO<sub>2</sub> auch am 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Substituenten vorgenommen werden (**170** vs. **174**) (**Abb. 31**).



**Abbildung 31:** Beispiele für den möglichen Ersatz der Nitrogruppe an den Benzylsubstituenten

Darüber hinaus war das Potential substituierter Indole zu ermitteln. Allgemein sollten in mehreren Syntheseyklen Reihen von Verbindungen synthetisiert werden und hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften optimiert werden, indem einzelne Molekülteile gezielt ausgetauscht wurden. Die erfolgreich dargestellten Verbindungen sollten dann im Arbeitskreis GREVELDING auf ihre antischistosomale Wirkung *in vitro* an kultivierten *Schistosoma mansoni*-Wurmpaaren getestet und die Synthesepanung entsprechend der Testergebnisse modifiziert und erweitert werden. Letztendlich sollten die jeweils besten Optimierungen aller Molekülteile miteinander kombiniert werden, um zu überprüfen, ob bei Kombination der optimierten Strukturelemente ein additiver Zusammenhang in Bezug auf die antischistosomale Aktivität besteht.



### **3 Synthese, Testung und Diskussion**

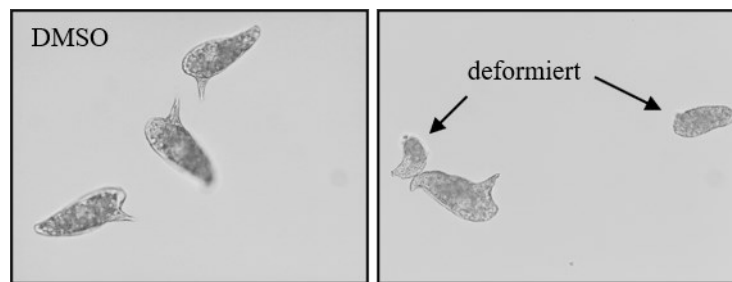
#### **3.1 Vorbemerkungen zu den biologischen Testungen**

##### **3.1.1 *In-vitro*-Testungen an *S. mansoni***

*In-vitro*-Testungen der synthetisierten Verbindungen an *S. mansoni* zur Beurteilung der antischistosomalen Wirksamkeit wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis GREVELDING der JUSTUS-LIEBIG-Universität in Gießen vorgenommen. Die Testungen wurden dabei allesamt eigenständig nach intensiver Einführung durch S. HÄBERLEIN durchgeführt. Testaufbau sowie Bewertung der Substanzwirkung orientierten sich an der Vorgehensweise der WHO-TDR (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*).<sup>[449,450]</sup> Für jede zu testende Substanz wurden 10 adulte, paarungsstabile *S. mansoni*-Pärchen verwendet. Diese wurden aus Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) durch hepatoportale Perfusion 46 Tage nach der Infektion mit Zerkarien erhalten und zunächst für 24 Stunden in Gruppen von 20 Paaren bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> in 60-mm-Petrischalen (GREINER BIO-ONE) mit M199-Medium (GIBCO) gehalten. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass ausschließlich fitte und paarungsstabile Pärchen für die Testung genutzt wurden, da sich instabile Paare in jener Zeit entpaaren konnten. Die 10 *S. mansoni*-Pärchen, die pro zu testender Substanz genutzt wurden, stammten im Idealfall von unterschiedlichen Hamstern, um die Robustheit des Assays zu erhöhen. Das Medium war mit 10% fetalem Kälberserum (NCS; SIGMA ALDRICH), 1% HEPES (1 M; pH = 7,5; CARL ROTH) und 1% ABAM (10.000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 mg Amphotericin B pro mL; GE HEALTHCARE) versetzt. Die Inhibitor-Experimente wurden in 6-well-Platten (GREINER BIO-ONE) durchgeführt. Die Substanzen wurden dazu in Dimethylsulfoxid (DMSO; p. a.-Qualität; SIGMA ALDRICH) gelöst. Ausgehend von einer 10 mM Stammlösung wurde zuerst eine Vorverdünnung von einer fünfmal so hohen Konzentration wie der Endkonzentration (bei 10 µM Endkonzentration 50 µM Vorverdünnung) in 1,1 mL M199-Nährmedium hergestellt und gut durchmischt. Im nächsten Schritt wurde davon 1 mL auf 4 mL Nährmedium gegeben. In einer Vergleichslösung wurde statt der Inhibitor-Stammlösung DMSO eingesetzt und analog verfahren. Die mit diesen Vergleichslösungen erzielten Testergebnisse dienten als Kontrollversuche (Negativ-Kontrolle). Im Laufe der dreitägigen Testreihe wurde die Substanzwirkung alle 24 Stunden unter dem Lichtmikroskop anhand folgender Gesichtspunkte beurteilt:

- 1.) Paarungsstabilität der Würmer
- 2.) Zahl und Aussehen produzierter Eier
- 3.) Motilität und Vitalität der Würmer
- 4.) phänotypische Veränderungen

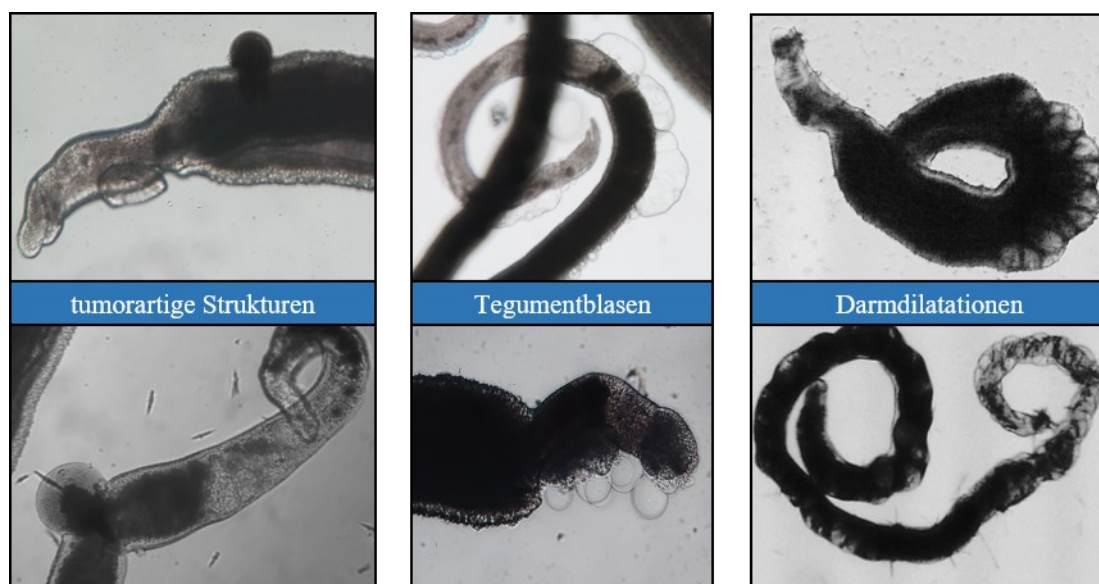
Die Paarungsstabilität konnte mittels der Anzahl gepaarter sowie entpaarter Würmer bestimmt werden. Die Eizahlen wiederum waren aufgrund der Tatsache, dass alle 24 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte, bei dem auch der Inhibitor erneut zugegeben wurde, nach 24, 48 und 72 Stunden zugänglich. Die Würmer wurden dabei in neu vorbereitete 6-*well*-Platten übertragen und die in den letzten 24 Stunden produzierten Eier gezählt. Dabei wurde zwischen normalen und deformierten Eiern unterschieden. **Abbildung 32** zeigt exemplarisch die Gestalt normaler (links) und deformierter Eier (rechts). Deformierte Eier unterscheiden sich dabei unter anderem in der Größe oder dem Fehlen des dornartigen Stachels. In einzelnen Fällen konnte auch unverbautes Eimaterial im *well* wahrgenommen werden. Bei der Transformation der Würmer von einem *well* zum anderen galt es, insbesondere Substanzverschleppungen zu vermeiden.



**Abbildung 32:** Vergleich der Eiformen von *S. mansoni* (normale vs. deformierte Eier)

Die Beurteilung der Motilität der Substanz-behandelten Schistosomen erfolgte mit Hilfe des WMS (*worm motility score*), eines *Scoring*-Systems, wonach jeder einzelne Wurm hinsichtlich seiner Motilität bepunktet wird. Dabei gilt: 4 = Hyperaktivität (häufige spastische Bewegungen), 3 = normale Aktivität (lebendige Bewegungen), 2 = reduzierte Motilität (schwache, langsame und seltene Bewegungen), 1 = minimale Aktivität (stark reduzierte Bewegungen, lediglich minimale Bewegungen von Kopf und Schwanz), 0 = keinerlei Bewegung (Letalität, sofern nach 20 Sekunden Beobachtungsdauer keinerlei Bewegung oder Darmperistaltik sichtbar wird). Der Gesamtscore ergibt sich letztlich aus der Summe aller Einzelwerte geteilt durch die Anzahl an Würmern. Ein Wurmpaar wird dabei doppelt gezählt, da es aus zwei Würmern besteht. Die Vitalität der Schistosomen ist eng verbunden mit deren Motilität. Ferner lässt sich über die Anzahl angesaugter Würmer am Boden einer jeden 6-*well*-Platte eine indirekte Aussage über die Vitalität der Schistosomen treffen. So verfügen Schistosomen über einen Kopf- und einen Bauchsaugnapf, mit denen sie sich im Regelfall festsaugen. Ist dies nicht der Fall, lässt dies einen Rückschluss auf die Aktivität eines potenziellen Inhibitors zu. Dabei sind einzelne nicht angesaugte Würmer noch kein Indiz für eine Wirksamkeit. Vielmehr ist die Gesamtheit aller Würmer entscheidend. Die Anzahl der nicht angesaugten Schistosomen konnte neben der visuellen Inspektion unter dem Mikroskop

auch durch leicht kreisende Bewegungen der 6-well-Platte auf einer Leuchtplatte ermittelt werden. Nicht angesaugte Würmer wurden durch die Bewegungen in Rotation versetzt, wohingegen angesaugte Würmer davon unberührt blieben. Phänotypen, welche durch einen Inhibitor potenziell verursacht werden konnten, waren vorwiegend folgender Art: (1) Schäden am Tegument (Blasenbildung, Warzenbildung, Aufrauung, Ablösung), (2) tumorartige Ausstülpungen, (3) Darmdilatationen, (4) Verformung der Schistosomen (lang, dick, aufgebläht, zusammengerollt), (5) (ödematöses) Aufquellen der Schistosomen, (6) Verlust innerer Strukturen, (7) Eiakkumulation im Uterus, (8) Anisocytose des Ovars (keine reifen Eizellen, keine Separierung) (**Abb. 33**).



**Abbildung 33:** Beispiele für potenziell auftretende Phänotypen

Als aktiv wurden alle jene Verbindungen eingestuft, die in irgendeiner Art und Weise zu Veränderungen an den Schistosomen und damit zu Abweichungen von der Norm führten. Aktiv waren also solche Verbindungen, welche die oben aufgeführten Parameter beeinflussten. Große Bedeutung wurde dem Auftreten von phänotypischen Veränderungen zugesprochen, wobei den Tegumentschäden, aber auch den Darmdilatationen eine größere Gewichtung zuteil wurde. Insbesondere Tegumentschäden wurden insofern als bedeutend angesehen, da diese in einem möglichen Tierversuch und damit im nächst komplexeren Testsystem im Idealfall zu einer Immunantwort des Wirts führen.<sup>[451]</sup> Das Tegument nimmt eine entscheidende Rolle bei der Nährstoffaufnahme, Sekretion, Osmoregulation und der Immunevasion ein.<sup>[452]</sup> Schäden des Teguments erleichtern die Penetration einer schistosomiziden Verbindung aber auch von Antikörpern in tiefer liegende Gewebeschichten, was letztlich schwerwiegende Schäden des Parasiten einschließlich der Störung der erwähnten physiologischen Prozesse zur Folge hat.<sup>[453,454]</sup> Somit wurden jene Verbindungen als besonders vielversprechend angesehen. Die

Anzahl von Entpaarungen wurde als schwächstes Kriterium bei der Beurteilung der Aktivität einer Verbindung eingestuft, da Entpaarungen von zahlreichen Umwelteinflüssen wie etwa der Temperatur oder der CO<sub>2</sub>-Konzentration beeinflusst werden können. Mitunter kam es auch beim DMSO-Kontrollversuch zu einzelnen Entpaarungen der Schistosomen, wenngleich die Motilität der einzelnen Würmer keine Veränderung zeigte. Als signifikant wurden 4 oder mehr entpaarte Wurmpaare angesehen. Die Paarungsstabilität ist eng verknüpft mit der Anzahl der produzierten Eier; sie ist essenziell für die Fortpflanzung der Schistosomen. Je weniger Paare im *well* anzutreffen sind, umso weniger Eier werden auch gelegt. Da auch die Eizahl starken Schwankungen unterliegt, wurde auch sie nicht als primäres Kriterium zur Einstufung der Aktivität gewählt, obwohl sie ursächlich für das Krankheitsbild der Schistosomiasis ist. Auch beim DMSO-Kontrollversuch konnten von Testung zu Testung bei gleicher Konzentration unterschiedlich viele Eier gezählt werden, die hinsichtlich der Gesamtzahl um mehrere hundert Stück abweichen konnten. Zwar ist im Falle der Aktivität einer Verbindung generell ein Rückgang der Eizahlen feststellbar, dieser Trend ist allerdings nur bei sehr starker Reduktion der Eizahl gut zu reproduzieren. Somit wurde eine Eizahl von weniger als 100 Eiern pro 24 Stunden vor allem in den beiden letzten Zeitintervallen als Inhibition gedeutet. Das erste Zeitintervall ist schwierig zu analysieren, da auch in den DMSO-Kontrollversuchen zum Teil geringere Eizahlen registriert wurden. Die Motilität wurde nach einer Vielzahl von Testungen als der Parameter mit der geringsten Streubreite eingestuft. Dieser kann zwar vom Experimentator leicht unterschiedlich bewertet werden, dennoch sollten grundsätzliche Trends aufgrund der klaren Definition des WMS erhalten bleiben. Als aktiv hinsichtlich der Motilität wurden alle Verbindungen eingestuft, die die Motilität innerhalb von 72 Stunden um 20% und mehr reduzierten ( $WMS \leq 2,4$ ). Für die Beurteilung der Aktivität einer Verbindung wurden daher folgende Kriterien in der beschriebenen Reihenfolge festgelegt:

- 1.) Phänotypen
- 2.) Motilität um mindesten 20% reduziert
- 3.) Eizahl unter 100
- 4.) Entpaarung  $\geq 4$

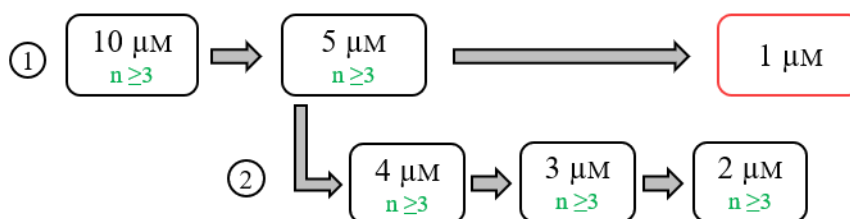
Grundsätzlich lässt sich sagen, dass meist alle Kriterien miteinander einhergehen. Traten mehrere Effekte nebeneinander auf, war eine Verbindung eindeutig als aktiv einzustufen. Beeinflusste eine Verbindung hingegen nur einen Parameter, wurde die Stärke des Effektes berücksichtigt und im Zweifelsfall zumindest in einer weiteren Testung überprüft. Die als aktiv eingestuften Verbindungen können anhand der Intensität der aufgetretenen Effekte und der

Anzahl beeinflusster Parameter gerankt werden und lassen sich dadurch untereinander vergleichen.

Um einen Überblick über die antischistosomale Wirksamkeit der dargestellten Substanzen zu erhalten, wurden diese initial bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet. Obwohl arbeitsgruppenintern eine Anfangskonzentration von 25  $\mu\text{M}$  üblich ist, wurde dennoch jene niedrige Konzentration gewählt, basierend auf den Erfahrungen mit den bisherigen Substanztestungen der Dithiocarbamate. Die verhältnismäßig geringe Konzentration und damit harte Selektion schien insofern sinnvoll, als die aktivsten Verbindungen von P. MÄDER in einem Konzentrationsbereich von 1-10  $\mu\text{M}$  *in vitro* wirksam waren.<sup>[286]</sup> Alle neuartigen, in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen bauen auf den Erkenntnissen der vorhergehenden Arbeit auf und stellen in gewisser Weise Strukturoptimierungen der von P. MÄDER gefundenen Substanzen dar. Idealerweise sollten daher die neuartigen Verbindungen wirksamer als die Ausgangsverbindungen sein. Zudem muss man bei der Neuentwicklung eines Wirkstoffs gegen die Schistosomiasis, letztendlich mit dem „Goldstandard“ Praziquantel konkurrieren. Praziquantel selbst ist *in vitro* je nach Medium in einer Konzentration von 1-5  $\mu\text{M}$  wirksam. Unter denselben Assay-Bedingungen wirkt PZQ bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  letal für die Männchen, bei den Weibchen hingegen erst bei 5  $\mu\text{M}$ . Eine deutliche Reduktion der Motilität zeigte sich bei beiden Geschlechtern aber auch noch bei 0,5  $\mu\text{M}$  (unveröffentlichte Daten AG GREVELDING). Ferner sollten dadurch auch Zeit, Wurmmaterial und der Einsatz von Hamstern reduziert werden.

Substanzen, die eine gute Wirksamkeit zeigten, wurden anschließend bei niedrigeren Konzentrationen getestet. Standardmäßig wurde eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für eine weitere Testung gewählt. Waren Verbindungen auch bei jener Konzentration noch aktiv, wurden sie schließlich bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  getestet. Sofern eine Verbindung bei 10  $\mu\text{M}$  aktiv war, wurde sie im Folgenden ein zweites Mal bei 10  $\mu\text{M}$  sowie erstmalig bei 5  $\mu\text{M}$  getestet. Die Reproduzierbarkeit der Effekte wurde bei allen Konzentrationen, bei denen eine deutliche Aktivität initial beobachtet wurde, ausreichend oft ( $n \geq 3$ ) verifiziert. Für jede Testung wurde eine neue Stammlösung angesetzt, um Einwägefehler zu minimieren. Die Stichprobenanzahl wurde merklich erhöht, wenn bei einer Verbindung die Streubreite der Testergebnisse ein bestimmtes Maß überschritt. Einige wenige Verbindungen wurden so bis zu acht Mal getestet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Verbindungen, die bei 5  $\mu\text{M}$  aktiv waren, bei 1  $\mu\text{M}$  aber nicht mehr, auch noch von 5  $\mu\text{M}$  an in 1  $\mu\text{M}$  Schritten nach unten titriert, um so die minimale aktive Konzentration ermitteln zu können, bei der die Substanz gerade noch wirksam war (**Abb. 34**). Jenes Vorgehen wurde anstelle einer  $\text{EC}_{50}$ -Wert-Bestimmung gewählt, die für

biologische Systeme normalerweise üblich ist. Der  $EC_{50}$ -Wert ist als mittlere effektive Konzentration definiert und stellt die Konzentration dar, bei der ein „halbmaximaler Effekt“ beobachtet wird. Fraglich ist aber, was als halbmaximaler Effekt definiert wird, beziehungsweise, welches Kriterium für die  $EC_{50}$ -Wert-Bestimmung herangezogen wird. Besonders interessant ist der  $EC_{50}$ -Wert in Kombination mit dem  $CC_{50}$ -Wert für die Selektivitätsbestimmung. Diese erübrigte sich bereits durch die Nicht-Bestimmbarkeit der  $CC_{50}$ -Werte, wie untenstehend erläutert wird. Somit wurde für Verbindungen mit einer Aktivität bis  $5\ \mu\text{M}$  nicht der  $EC_{50}$ -Wert, sondern die eben beschriebene Titration durchgeführt, um jene Verbindungen für eine Weiterentwicklung besser differenzieren und damit priorisieren zu können. Die Überprüfung einer Konzentrationsabhängigkeit der Effekte war auch hier gegeben.



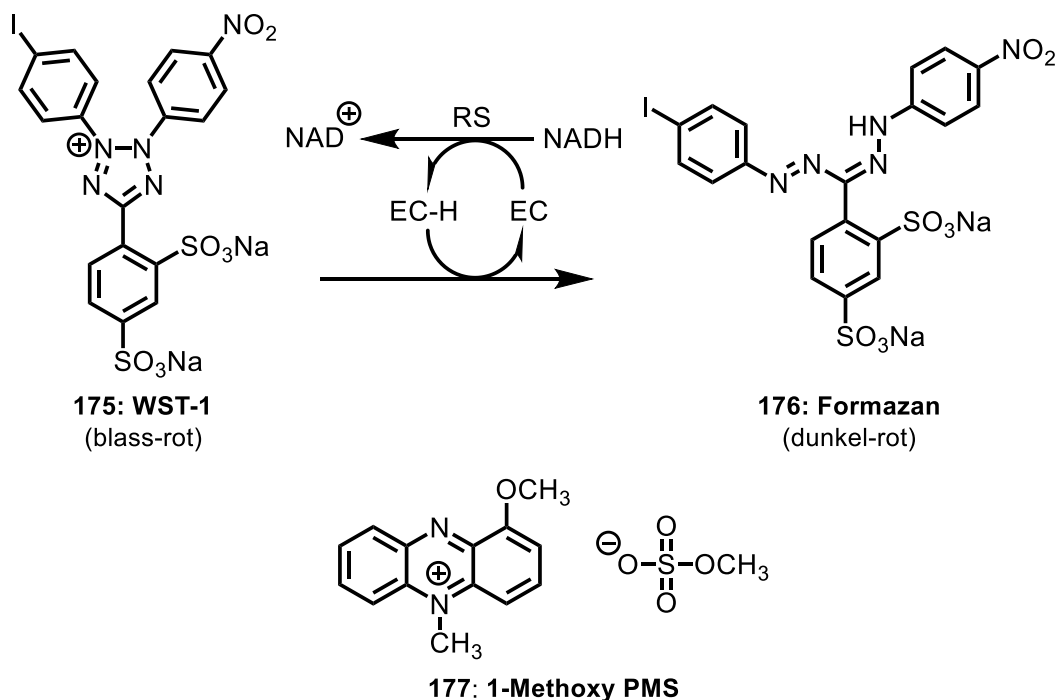
**Abbildung 34:** Arbeitsablauf bei der für die Testung gewählten Konzentrationen

Alle erzielten Testergebnisse sind der **Tabelle I** (S. 378) im Anhang zu entnehmen. Zur graphischen Darstellung der Testergebnisse wurde in der Arbeit die Form der Balkendiagramme gewählt. Aufgrund der Fülle an Daten wurde jedoch nur eine Auswahl getroffen. Allerdings wurde darauf geachtet, dass sich alle aktiven Verbindungen in den Balkendiagrammen wiederfinden. Dargestellt wurden zum einen die Eizahlen. Hierfür wurden die absoluten Werte mit den Eizahlen der dazugehörigen DMSO-Kontrollen gewählt. Auf eine Normierung wurde dabei verzichtet, weil keine grundsätzliche Korrelation zwischen den Eizahlen innerhalb einer Testung bestand. Vielmehr wurde beobachtet, dass die Eizahlen unter Umständen sehr stark schwankten und beispielsweise eine hohe Eizahl im DMSO-Kontrollversuch nicht zwangsläufig mit einer grundsätzlich erhöhten Eizahl innerhalb der Testreihe einherging. Dadurch wäre denkbar, dass etwaige Effekte durch eine hochregulierte Eiproduktion im DMSO-Kontrollversuch und eine im Vergleich dazu verminderte Eizahl bei einer zu testenden Verbindung ausgelöst werden. Um dies zu vermeiden, wurden bevorzugt die absoluten Werte dargestellt. Zum anderen wurde der WMS für die Darstellung gewählt. Hierbei wurden die Scores auf die DMSO-Kontrolle normiert. Da die DMSO-Kontrolle fast ausschließlich mit einem Score von 3 bepunktet wurde, sind an dieser Stelle keine Fehlerbalken zu sehen. Bei den zu testenden Verbindungen wurden nur die aktiven Verbindungen reproduziert. Somit ist nur bei diesen Verbindungen ein Fehlerbalken eingezeichnet. Wie in der

**Tabelle I** im Anhang wurde auch in den Graphen der Fehlerbalken als Standardfehler dargestellt. Um letale Effekte, die unterhalb von 33% Motilität ( $WMS < 1$ ) auftreten, zu kennzeichnen, wurde eine gestrichelte Linie bei  $y = 33$  eingefügt. Zum Teil wurde zum Vergleich mit anderen Verbindungen eine weitere Linie in roter Farbe hinzugefügt; diese ist im Graphen selbst eindeutig beschriftet.

### 3.1.2 Messung der Zytotoxizität

Für die weitere Optimierung der Substanzen ist es wichtig zu wissen, ob diese ausschließlich gegen Schistosomen wirken oder ob humane Zellen gleichermaßen von einer etwaigen Wirkung betroffen sind und gegebenenfalls geschädigt werden. Aus diesem Grund wurden die antischistosomal aktiven Verbindungen allesamt in Kooperation mit Prof. GRÜNWELLER auf ihr zytotoxisches Potential getestet. Dazu wurde die Zellviabilität bestimmt, also der Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation nach Inkubation mit den zu testenden Verbindungen. Dies erfolgte mit Hilfe des sogenannten WST-1-Assays. WST-1 (**175**; *water soluble Tetrazolium*) ist ein Tetrazoliumsalz, das indirekt durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase in einer Reduktionsreaktion zum Formazan (**176**) umgesetzt wird (**Schema 24**).<sup>[455,456]</sup> Dieses weist ein anderes Absorptionsspektrum als WST-1 auf, sodass die Kinetik der Reaktion kolorimetrisch verfolgt werden kann.

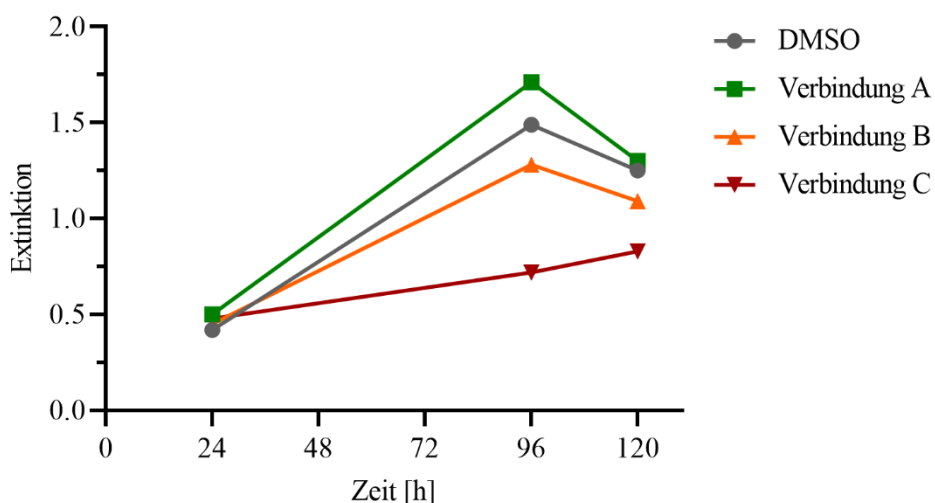


**Schema 24:** Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST-1 zum Formazan zur Bestimmung der Zellviabilität. Der Elektronendonator (EC-H) wird dabei durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System (RS) aus dem Elektronenakzeptor (EC) bereitgestellt.

Bei der Succinat-Tetrazolium-Reduktase handelt es sich um ein Enzym, das in der Atmungskette in den Mitochondrien vorkommt und nur in lebensfähigen Zellen aktiv ist. Sterben Zellen ab, wird demzufolge weniger Formazan gebildet. Am Umsatz des Tetrazoliumsalzes im Medium lässt sich somit die Aktivität der Zellen messen. Die Menge an gebildetem Formazan, die der Anzahl lebender Zellen proportional ist, kann durch die Messung der Absorption bzw. Extinktion mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge  $\lambda = 420\text{-}480\text{ nm}$  quantifiziert werden. Hierzu wird die Extinktion Substanz-behandelter Zellen mit der Extinktion von unbehandelten Zellen verglichen. Da WST-1 selbst nicht in die Zellen penetrieren kann, wird zusätzlich Phenazinmethosulfat (177; PMS) eingesetzt. PMS kann die Zellmembran passieren und wird dann von den lebenden Zellen durch die NADPH-abhängige Succinat-Tetrazolium-Reduktase reduziert. Das reduzierte PMS ist nun seinerseits wieder in der Lage, WST-1 extrazellulär zum Formazan zu reduzieren. Es wirkt somit als Elektronenkoppler.<sup>[457]</sup> Die Verbindungen wurden zunächst standardmäßig gegen die Leberzelllinie HepG2, ein gängiges Zellsystem, bei 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  getestet. Dabei handelt es sich um menschliche Zellen, die aus einem Hepatoblastom isoliert wurden und in ihren morphologischen Eigenschaften den humanen Leberparenchymzellen ähneln. Die HepG2-Zellen besitzen die Fähigkeit, zahlreiche Phase-1- und Phase-2-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus zu exprimieren, die auch für die Biotransformation von Medikamenten von herausragender Bedeutung sind.<sup>[458]</sup> Dazu zählt vorwiegend die Familie der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP), eine Klasse von Monooxygenasen, die formal ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen. Somit können HepG2-Zellen Fremdstoffe aktivieren und detoxifizieren, ohne dass jene Enzyme künstlich exogen zugesetzt werden müssen. Dadurch spiegeln sie den Metabolismus von Fremdstoffen (Xenobiotika) im menschlichen Körper besser wider als inkompetente Zellen. Ferner sezernieren sie die meisten Plasmaproteine, die auch für humane Hepatozyten charakteristisch sind wie beispielsweise Fibrinogen, Apolipoproteine oder Albumin.<sup>[459]</sup> Aufgrund der Tatsache, dass sich *S. mansoni* vor allem in den Mesenterialvenen, also in der Darmwand einnistet, sollte sich ein therapeutisch nutzbarer Inhibitor optimalerweise dort anreichern und bioverfügbar sein. Daher wurden die meisten Verbindungen auch auf ihr zytotoxisches Potential gegenüber der Darmepithelzelllinie LS174T untersucht. Krebszelllinien werden auch deshalb eingesetzt, weil sie sich verhältnismäßig einfach in Kultur halten lassen. Zudem besitzen sie eine uneingeschränkte Lebensdauer. Während normale Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Verdopplungen in einen Zustand übergehen, in dem sie sich nicht mehr teilen, ist dies bei Krebszellen nicht der Fall. Sie haben die Fähigkeit, sich uneingeschränkt zu teilen.



**Abbildung 35** zeigt exemplarisch die während einer Testung der Zytotoxizität erhaltenen Messwerte. Die Zellen wurden hierzu über einen Zeitraum von bis zu 120 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Um den zeitlichen Verlauf verfolgen zu können, wurden parallel mehrere Ansätze durchgeführt und diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten (meist nach 24, 96 und 120 h) vermessen. Alternativ wurde die Probe ausschließlich zu einem definierten Zeitpunkt (meist zwischen 72 und 96 h) gemessen. Dazu wurde nach Zugabe von WST-1 die Extinktion durch das Formazan bestimmt (genaues Vorgehen bei der Testung ist dem Anhang zur Zytotoxizität zu entnehmen). Zu erkennen ist, dass mit fortlaufender Zeit die Extinktion ansteigt und eventuell ein schwach ausgeprägtes Maximum durchläuft. Dies liegt an der Zunahme der Anzahl an Zellen, wodurch immer mehr Formazan gebildet wird. Der plötzliche Abfall der Extinktion nach 96 h, der auch beim DMSO-Kontrollversuch auftrat, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen in dieser Phase durch ihr fortwährendes Teilen in solch hoher Anzahl vorliegen, dass sie sich fortan gegenseitig beeinflussen. Für die Einstufung der Zytotoxizität wird im Regelfall der Endpunkt der Messung betrachtet; in diesem Fall ist jedoch der letzte Zeitwert (der Wert nach 96 h) vor dem Abfall der Extinktion entscheidend. **Verbindung A** zeigt zu jenem Zeitpunkt eine stärkere Extinktion als die DMSO-Kontrolle und ist damit als nicht zytotoxisch gegenüber der getesteten Zelllinie einzustufen. **Verbindung B** indessen zeigt eine gegenüber dem DMSO-Standard verminderte Extinktion. Sofern diese um maximal 20% von der DMSO-Kontrolle abweicht, wie das hier der Fall ist, gilt eine Verbindung ebenfalls als nicht zytotoxisch. **Verbindung C** ist demnach eindeutig als zytotoxisch zu klassifizieren; die Extinktion ist immer mehr als 20% gegenüber dem Standard reduziert.

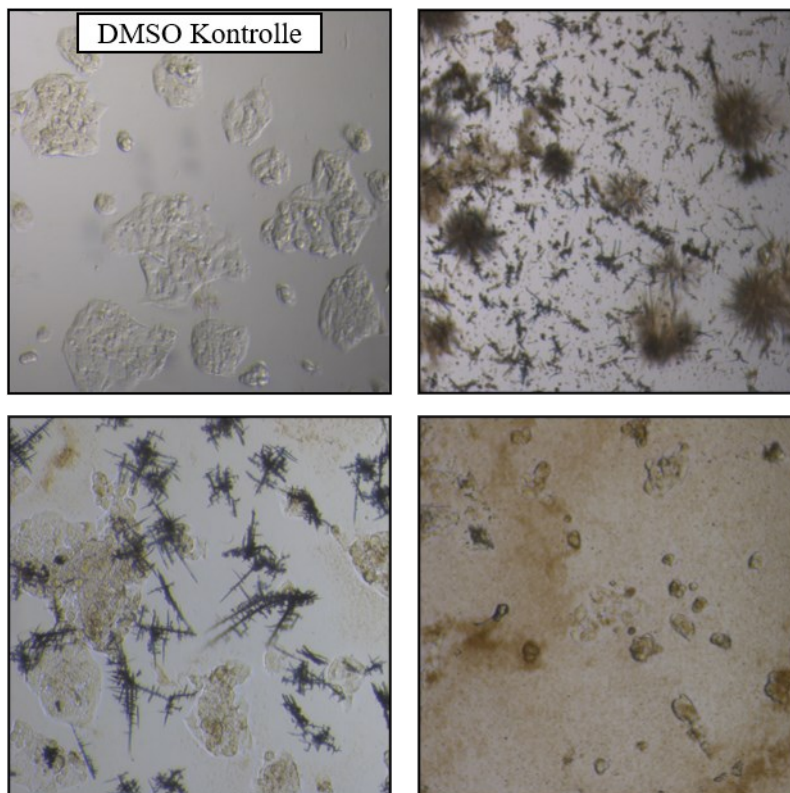


**Abbildung 35:** Graphische Darstellung der Extinktion in Abhängigkeit der Zeitdauer bei der Zytotoxizitätsmessung

Innerhalb der Arbeit werden keine weiteren Graphen dieser Art mehr aufgeführt. Vielmehr werden antischistosomal aktive Verbindungen als zytotoxisch oder nicht zytotoxisch

gekennzeichnet. Eine vollständige Auflistung aller auf ihre Zytotoxizität getesteten Verbindungen ist der **Tabelle V** (S. 577) im Anhang zu entnehmen.

Bei der Zytotoxizitätsmessung trat das Problem der schlechten Löslichkeit vieler Testverbindungen in dem wässrigen Zellkulturmedium auf, was sich durch ein teilweises Ausfällen der Substanzen bemerkbar machte. Die makroskopisch festen Partikel dienten dann als Kristallisationskeime und erleichterten die unerwünschte Bildung von Kristallen, was sonst nur aus gesättigten Medien möglich ist (**Abb. 36**).



**Abbildung 36:** Beispiele für Kristallbildung im Zellkulturmedium nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen

Dies stellt insofern ein Problem dar, als dadurch über die Konzentration, also die in der Lösung befindliche Substanzmenge, keinerlei Aussage mehr möglich ist. Ferner werden dadurch auch Ergebnisse verfälscht, da eine Zelle somit letztlich weniger Substanz aufnimmt als angenommen und dadurch, sofern diese zellschädigende Eigenschaften besitzt, weniger stark geschädigt wird. Auch eine verminderte Zellviabilität aufgrund der Präzipitation wäre grundsätzlich denkbar. Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Bestandteile des Mediums mit ausfallen; zum anderen ist fraglich, ob allein durch Kristallbildung das Zellwachstum beeinflusst wird. Deshalb wurde für das weitere Vorgehen beschlossen, vor Beginn des WST-Assays zunächst ein *Screening* hinsichtlich der Löslichkeit durchzuführen. Die Substanzen wurden dafür zunächst über 24 h im Zellkulturmedium inkubiert und dann

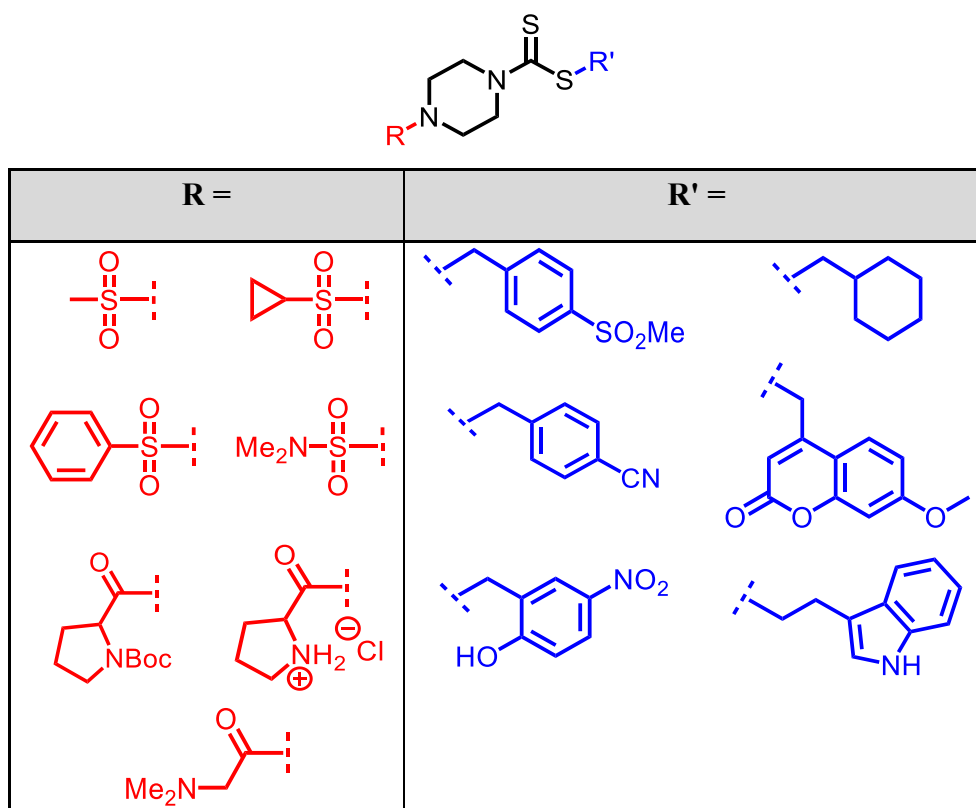
unter dem Mikroskop analysiert. Nach Abschätzung der Löslichkeit anhand der Kristallbildung wurden nur Verbindungen ohne Präzipitationserscheinungen weiterverfolgt und einer Zytotoxizitätsmessung unterzogen.

Derartige Löslichkeitsprobleme wurden bei der *in-vitro*-Testung an *S. mansoni* nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist vermutlich die 10-fach höhere Konzentration bei der Zytotoxizitätsmessung. Des Weiteren ist auch die unterschiedliche Zusammensetzung der Kulturmedien als Ursache denkbar. Ferner wurde bei der *in-vitro*-Testung alle 24 h das Medium gewechselt und die Substanz erneut hinzugegeben; die Testung endete dann nach 72 h. Bei der Zytotoxizitätsmessung geschah dies nicht. So könnte die Inkubation von bis zu 120 h ohne Mediumswechsel die Problematik verschärft haben. Vermutlich nimmt die Präzipitation mit zunehmender Inkubationszeit drastisch zu.

Die geringe Löslichkeit der Substanzen ist auch ein Grund, warum ein  $CC_{50}$ -Wert, also die Konzentration, bei der die Zellviabilität um 50% reduziert ist, nicht bestimmt werden konnte. Dies wiederum führte dazu, dass der Selektivitätsindex, der als Quotient aus dem  $CC_{50}$ - und dem  $IC_{50}$ -Wert definiert ist, nicht ermittelt werden konnte. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine „halbmaximale Inhibition“ beobachtet wird. Dennoch lässt sich zumindest näherungsweise ein Selektivitätsindex bei einer Aktivität von  $10\ \mu\text{M}$  und keiner Zytotoxizität bei  $100\ \mu\text{M}$  auf einen Wert von mindestens  $(CC_{50}/IC_{50}) \sim 10$  schätzen. Die aktivsten Verbindungen in dieser Arbeit, die bis  $3\ \mu\text{M}$  bzw.  $2\ \mu\text{M}$  aktiv sind, weisen demnach einen Selektivitätsindex  $\geq 33$  bzw.  $\geq 50$  auf.

### 3.2 Kombinationsserie 1

Als Fortsetzung der Arbeit von P. MÄDER wurden zunächst die sechs wirksamsten Substituenten am einfach gebundenen Schwefelatom des Dithiocarbamats mit den sieben wirksamsten Substituenten am endständigen Stickstoffatom des Piperazins kombiniert.<sup>[286]</sup> In den letzten Optimierungsserien, das heißt der Konjugation mit Aminosäuren, der Kondensation mit Sulfonsäurechloriden und der Einführung von hydrophilen Gruppen tragenden Alkylsubstituenten waren diese Substituenten gefunden worden. Bei den Resten am S-Atom handelt es sich um einen 4-(Methylsulfonyl)benzyl-, 4-Cyanbenzyl-, 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-, Cyclohexylmethyl-, (7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl- und einen 2-(1H-Indol-3-yl)ethyl-Rest (**Abb. 37**). Der 4-Nitrobenzyl-Rest, der ebenfalls zu den wirksamsten Substituenten am S-Atom gehört, wurde bereits während der weiteren Optimierung als feststehender Substituent verwendet und taucht somit nicht in der Kombinationsserie 1 auf, da entsprechende Derivate schon existierten und getestet wurden. Als Substituenten am endständigen N-Atom des Piperazins wurden ein Methylsulfonyl-, Cyclopropylsulfonyl-, Phenylsulfonyl-, Dimethylsulfonyl-, Dimethylglycyl- und ein (Boc)-Prolinyl-Rest getestet.

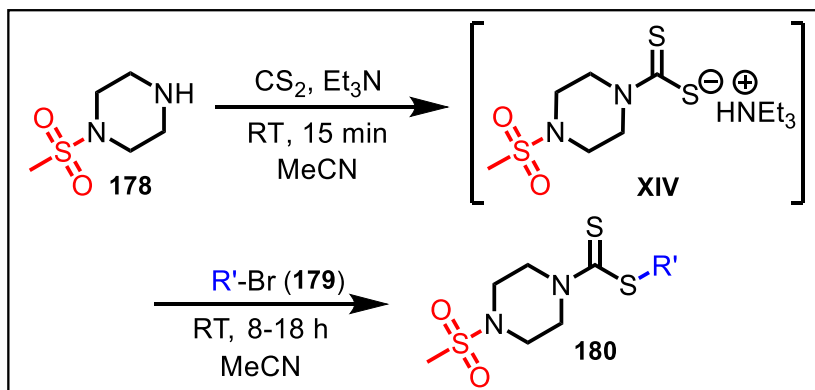


**Abbildung 37:** Übersicht der wirksamsten Substituenten am S-Atom bzw. N-Atom nach vorangegangener Optimierung der Dithiocarbamate durch Konjugation mit Aminosäuren, Kondensation mit Sulfonsäurechloriden und der Einführung von hydrophilen Alkylsubstituenten

Es wurden also insgesamt zweiundvierzig neue Verbindungen synthetisiert und auf ihre Aktivität getestet. Ziel der Kombination war zum einen eine Steigerung der antischistosomalen Aktivität durch Addition der Einzeleffekte der zuvor gut wirksamen Substituenten, zum anderen eine Ausweitung der Aktivität auf eine Vielzahl von neuartigen Verbindungen und damit eine Validierung der zuvor angestellten Beobachtungen und der davon abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen.

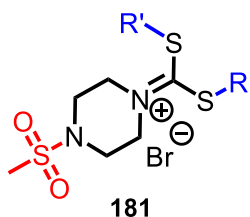
### 1-(Methylsulfonylpiperazin)-Teilstruktur

Die Synthese der Dithiocarbamate mit dem Methylsulfonyl-Substituenten erfolgte ausgehend von kommerziell erhältlichem 1-(Methylsulfonyl)piperazin. Diese wurden in einer *one-pot*-Reaktion nach einer Vorschrift von SAIDI *et al.*, die bereits von P. MÄDER modifiziert worden war, dargestellt.<sup>[460]</sup> 1-(Methylsulfonyl)piperazin (**178**) wird hierbei unter basischen Bedingungen zunächst mit Kohlenstoffdisulfid zum Dithiocarbat-Anion **XIV** umgesetzt. Dieses reagiert dann in einer bimolekularen nucleophilen Substitution mit den entsprechenden Bromiden (**179**) zu den jeweiligen Dithiocarbamaten (**180**) (Schema 25).

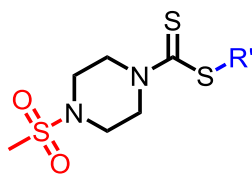


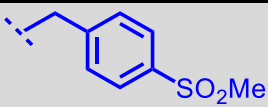
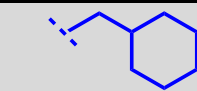
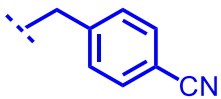
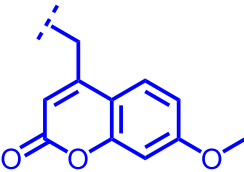
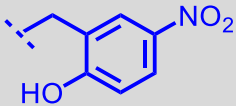
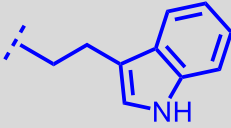
**Schema 25:** *One-pot*-Reaktion zur Darstellung der Dithiocarbamate am Beispiel von 1-(Methylsulfonyl)piperazin

Erhaltene Produkte sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Insgesamt führte die Synthese der Dithiocarbamate ausgehend von 1-(Methylsulfonyl)piperazin, mit Ausnahme des 4-Cyanbenzyl-Derivates **Schl-33.165**, zu mittelmäßigen bis dürftigen Ausbeuten. Dies ist möglicherweise auch auf die Bildung von 2-Iminium-1,3-dithiolan-Salzen (**181**) zurückzuführen, die aus der Literatur bekannt sind (**Abb. 38**).<sup>[461,462]</sup>



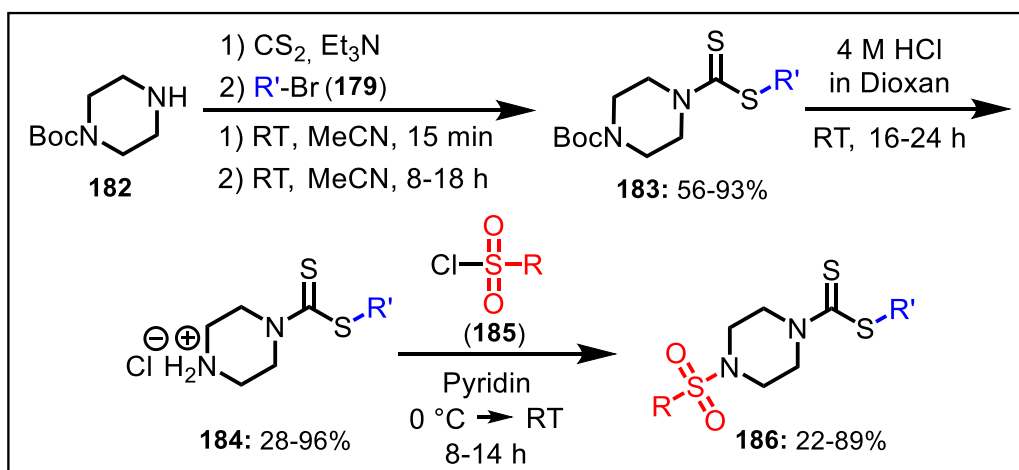
**Abbildung 38:** 2-Iminium-1,3-dithiolan-Salze als mögliche Nebenprodukte der *one-pot*-Reaktion

**Tabelle 2:** Strukturformeln und Ausbeuten der Produkte der Kombinationsserie 1 mit 1-(Methylsulfonyl)piperazin


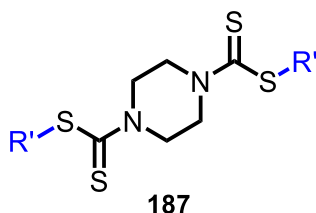
R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.001</b>	47	 <b>Schl-33.174</b>	35
 <b>Schl-33.165</b>	76	 <b>Schl-33.003</b>	34
 <b>Schl-33.004</b>	37	 <b>Schl-33.152</b>	57

### Sulfonylpiperazin- bzw. Sulfamoylpiperazin-Teilstruktur

Die Kombination des Cyclopropylsulfonyl-, Phenylsulfonyl- und Dimethylsulfamoyl-Restes mit den Schwefel-Substituenten erfolgte nach einer leicht abgewandelten Syntheseroute, die von Boc-Piperazin (**182**) anstelle von 1-(Methylsulfonyl)piperazin ausging und ebenso zunächst eine *one-pot*-Reaktion mit Kohlenstoffdisulfid vorsah (**Schema 26**).


**Schema 26:** Reaktionssequenz zur Darstellung der Dithiocarbamate mit Sulfonylpiperazin-Teilgerüst ausgehend von Boc-Piperazin

Die Verwendung der Boc-Schutzgruppe sollte dabei die Bildung von ebenfalls literaturbekanntem Dialkylpiperazin-1,4-bis(carbodithioat) (**187**) verhindern (**Abb. 39**).<sup>[463]</sup>



**Abbildung 39:** Dialkylpiperazin-1,4-bis(carbodithioat) als Nebenprodukte der *one-pot*-Synthese von CS<sub>2</sub> mit Piperazin

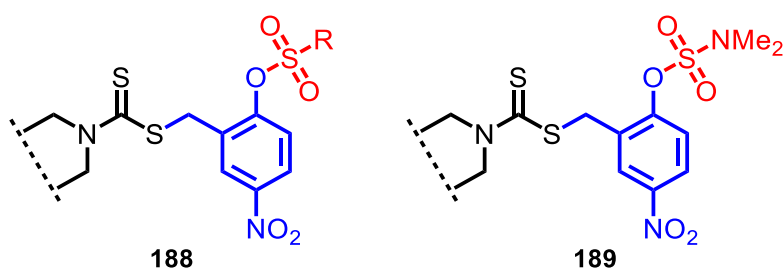
Die synthetisierten Boc-Piperaziny-Dithiocarbamate (**183**) wurden darauffolgend säurekatalytisch unter gleichzeitiger Bildung von CO<sub>2</sub> und Isobuten entschützt und zu den Piperazinium-Chloriden (**184**) umgesetzt. Diese wiederum wurden in einer Kondensationsreaktion in wasserfreiem Pyridin nach einer Vorschrift von CHAPMAN *et al.* mit den entsprechenden Sulfonsäurechloriden oder dem Sulfamoylchlorid (**185**) zur Reaktion gebracht.<sup>[464]</sup> Die Gesamtausbeuten der Produkte (**186**) über alle drei Stufen sind der **Tabelle 3** zu entnehmen.

Lediglich die Synthesen von **Schl-33.015**, **Schl-33.173** und **Schl-33.171** verliefen mit zufriedenstellenden Gesamtausbeuten  $\geq 65\%$ , wobei die Ausbeuten der ersten beiden Stufen aller Verbindungen mit jeweils  $\sim 85\%$  und  $\sim 90\%$  als gut zu bewerten waren. Eine Ausnahme stellt hier das Cyclohexylmethyl-Derivat mit 56% und 28% Ausbeute dar. Der letzte Wert ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass gemäß Vorschrift das Edukt in Dioxan zu lösen und mit einer 4 M HCl-Lösung umzusetzen ist. Dies führt zum Ausfällen des Produktes aus der Lösung, woraufhin dieses abgesaugt werden kann. Eine weitere Aufarbeitung und Reinigung der Reaktionslösung wurden nicht durchgeführt, sodass nicht ausgefallene Substanz verworfen wurde.

**Tabelle 3:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten der Produkte der Kombinationsserie 1 mit Sulfonylpiperazin- oder Sulfamoylpiperazin-Teilgerüst

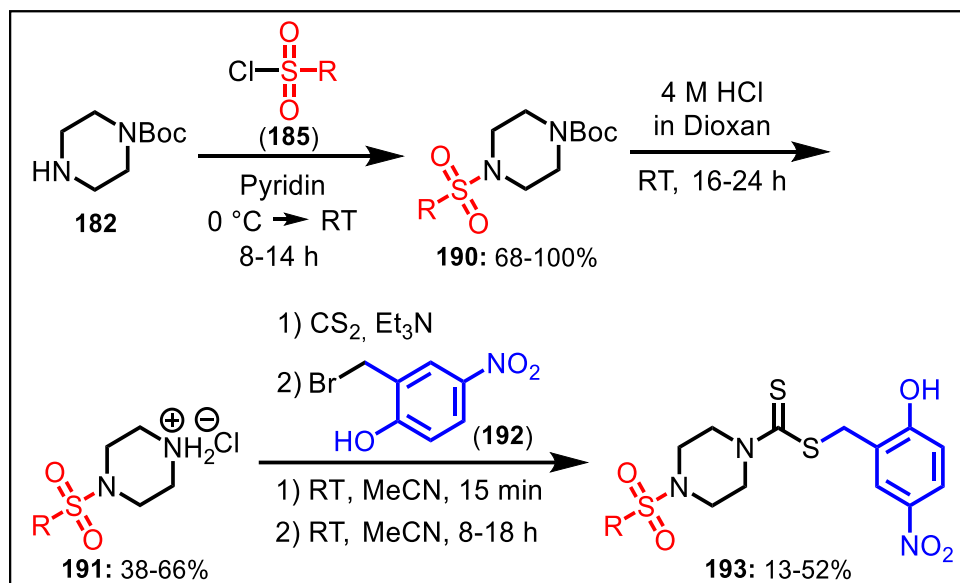

<div style="text-align: center;"> <b>R =</b>   <b>R' =</b> </div>						
	Schl-33.	Ausbeute in%	Schl-33.	Ausbeute in%	Schl-33.	Ausbeute in%
	...015	65	...014	28	...021	46
	...172	30	...173	67	...171	72
	...182	8	...181	6	...183	4
	...023	14	...022	47	...072	50
	...525	37	...236	42	...015	41
	...102	19	...108	23	...111	34

Die Reaktionen der Sulfonsäurechloride und des Sulfamoylchlorids mit dem 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid wurde nach einer anderen Synthesefolge vorgenommen. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass hier in Vorarbeiten die Bildung von Sulfonsäureestern (**188**) und Phenol-*O*-sulfamaten (**189**) beobachtet wurde (**Abb. 40**).


**Abbildung 40:** Sulfonsäureester und Phenol-*O*-sulfamate als Nebenprodukte bei der Synthese der 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Derivate



Ausgehend von Boc-Piperazin (**182**) erfolgte zunächst die Kondensation mit den Sulfonsäurechloriden und dem Sulfamoylchlorid (**185**). Es schlossen sich die säurekatalysierte Boc-Entschützung und abschließend die Umsetzung mit Kohlenstoffdisulfid zum Dithiocarbat (**193**) an (Schema 27).



**Schema 27:** Reaktionssequenz zur Darstellung der Dithiocarbamate mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest und Sulfonylpiperazin- bzw. Sulfamoylpiperazin-Teilgerüst

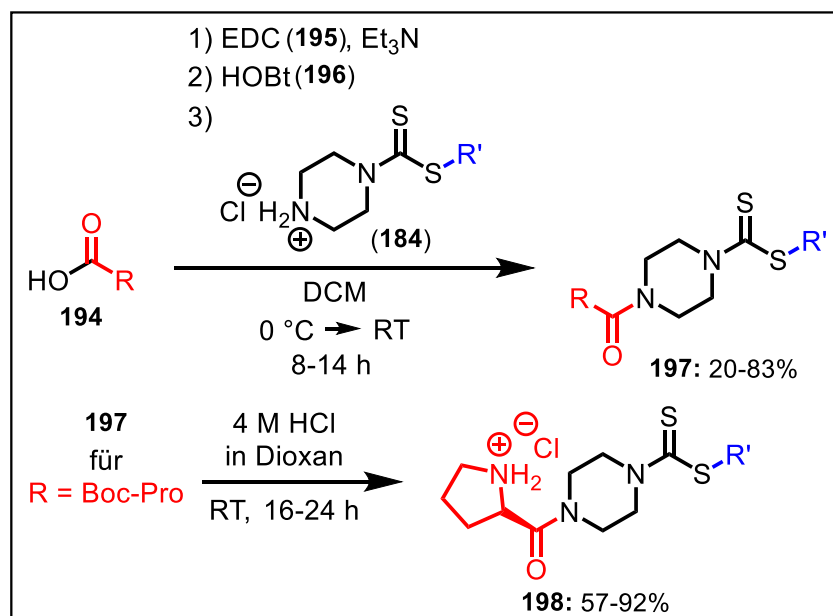
Auch hier fielen die Gesamtausbeuten wiederum eher dürftig aus, was vor allem auf die Boc-Entschützung und *one-pot*-Reaktion mit CS<sub>2</sub> zurückzuführen ist (Tab. 3). Die polare und schwach acide Phenol-Gruppe, die im letzten Schritt der Synthese eingeführt wurde, hatte Produkte zur Folge, die bei der säulenchromatographischen Trennung Probleme machten.

### Aminosäurekonjugate der Dithiocarbat-Derivate

Die Konjugation des Grundgerüsts der Dithiocarbamate mit einer Aminosäure in der Arbeit von P. MÄDER, die hier zur Auswahl von Dimethylglycin und Prolin führte, hatte das Ziel einer aktiven Aufnahme durch etwaige Aminosäuretransporter und damit einer verbesserten Wirksamkeit.<sup>[286]</sup> In der Literatur sind verschiedene schistosomale Aminosäuretransporter beschrieben, welche sich vor allem im Tegument der Schistosomen befinden.<sup>[465–467]</sup> Es ist bekannt, dass Schistosomen verschiedene Aminosäuren assimilieren, unter denen sich auch Glycin und Prolin befinden. Die Aminosäuren werden von den Schistosomen-Weibchen in den Darm, das Ovar und das Vitellarium eingebaut, wohingegen dies bei den Schistosomen-Männchen vorrangig in der Gastrodermis und den Testes erfolgt.<sup>[468]</sup> Außer der Aufnahme von Aminosäuren durch Diffusion und damit passiven Transport, gibt es Hinweise darauf, dass einige Aminosäuren (insbesondere Prolin) hauptsächlich aktiv aufgenommen werden.<sup>[465]</sup> Es war daher naheliegend, die Aminosäure als eine Art „trojanisches Pferd“ zu nutzen, um das

Dithiocarbamat in den Wurm zu bringen, wo es dann seine Wirkung entfalten kann. Außer den freien Prolin-Derivaten galt es auch die Boc-geschützten Verbindungen zu testen, was sich damit erklären lässt, dass diese *Prodrugs* darstellen und durch eine Esterase in die ungeschützten Derivate überführt werden müssten. Als *Prodrugs* werden all jene Verbindungen ohne eigene biologische Aktivität aufgefasst, die durch chemische Reaktionen (zumeist enzymatische Transformationen) *in vivo* in ihre aktive Wirkform umgewandelt werden. Der Vorteil liegt also darin, dass die hydrophobe *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe die polare und protonierbare Amino-Gruppe maskiert, wodurch die Verbindungen, bleibt der aktive Transport zunächst einmal unberücksichtigt, besser aufgenommen werden sollten.

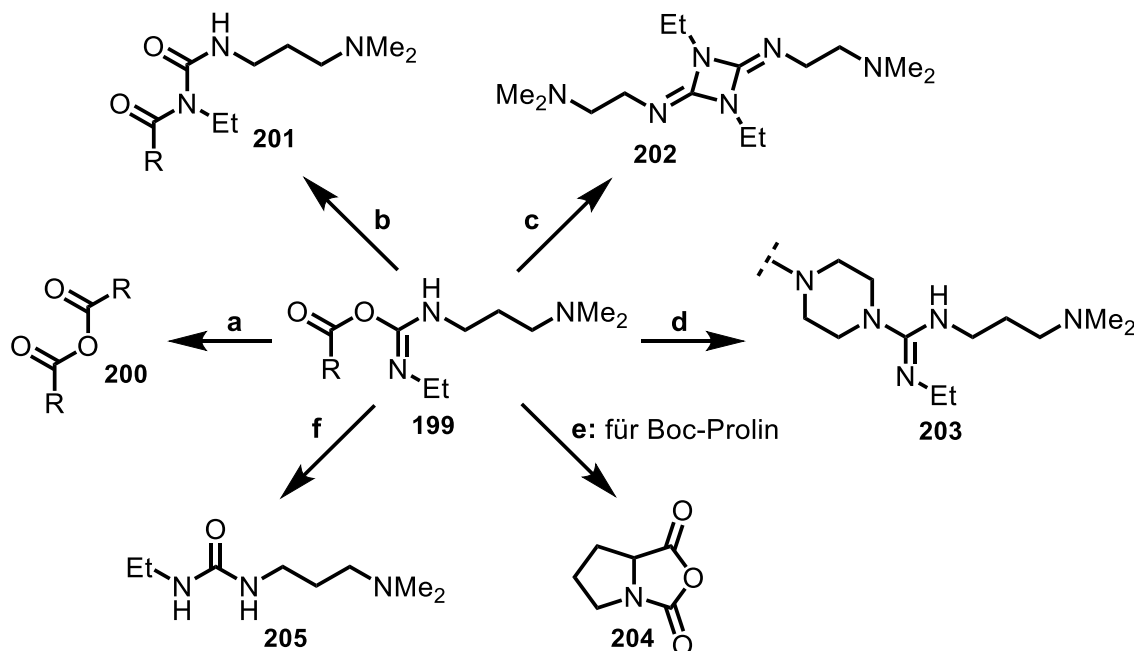
Die Piperazinamide **197** wurden ausgehend von Boc-L-Prolin oder Dimethylglycin (**194**) und den jeweiligen Amin-Hydrochloriden **184** mit Hilfe der Kupplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC; **195**) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt; **196**) sowie Triethylamin als Base dargestellt (**Schema 28**). Die Schutzgruppe des Prolins diente dazu, der Bildung eines Prolin-Dipeptids entgegenzuwirken.



**Schema 28:** EDC-Kupplung zur Darstellung der Dithiocarbamate mit *N*-Acylpiperazin-Teilgerüst ausgehend von den Piperazin-Hydrochloriden und Boc-Entschützung der Prolin-Derivate

Die Reaktanden wurden zeitversetzt miteinander zur Reaktion gebracht. Die Carboxylgruppe der Säure **194** wird dabei mit dem Carbodiimid **195** zunächst in einen reaktiven *O*-Acylisoharnstoff überführt, der nachfolgend mit dem Benzotriazol **196** zu einem sogenannten Aktivester umgesetzt wird, welcher dann mit dem Amin **184** in Reaktion tritt. Dabei sind folgende Nebenreaktionen denkbar, die allesamt vom *O*-Acylisoharnstoff **199** ausgehen (**Abb. 41**): (a) Die Bildung eines symmetrischen Anhydrids (**200**), über das die Reaktion ebenso zum Carbonsäureamid verläuft. Dabei werden allerdings zwei Äquivalente

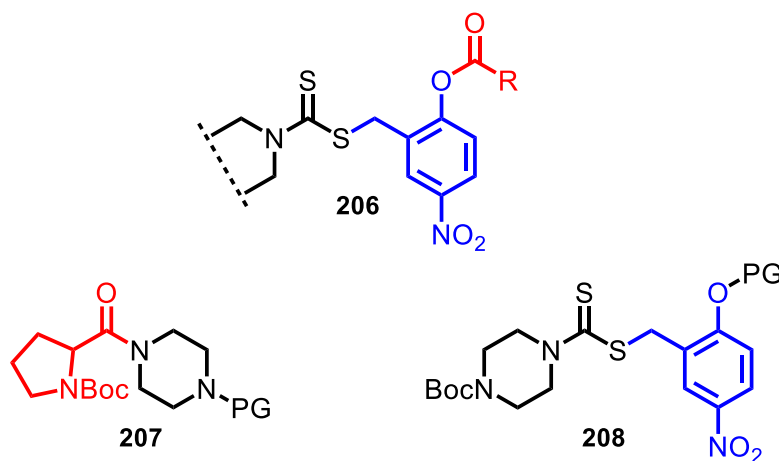
Säure pro Äquivalent Amin verbraucht. (b) Eine 1,3-Umlagerung, in welcher der *O*-Acylisoharnstoff **199** (*O*-Acyllactim) irreversibel in den *N*-Acylharnstoff **201** übergeht, wodurch ein Abbruch der Kupplungsreaktion unter Verlust der Carbonsäure erfolgt. Dies kann jedoch in Anwesenheit eines weiteren Nucleophils wie dem Amin weitestgehend ausgeschlossen werden, da diese Reaktion sehr langsam abläuft.<sup>[469]</sup> (c) Die Bildung von Diazetidin **202** durch Reaktion mit einem weiteren Molekül des Carbodiimids.<sup>[470]</sup> (d) Ein Angriff des Amins **184** auf den *O*-Acylisoharnstoff **199** unter Bildung eines Guanidins (**203**). (e) Das Boc-geschützte Prolin ist überdies in der Lage über das Sauerstoffatom der *tert*-Butyloxy-Gruppe einen Angriff auf die aktivierte Carboxylgruppe unter Bildung eines *N*-Carboxyanhydrids (**204**) vorzunehmen.<sup>[471,472]</sup> (f) Auch ist die Hydrolyse von Carbodiimid **195** oder des *O*-Acylisoharnstoffs **199** zum Harnstoff **205** möglich. Eine Epimerisierung am C $_{\alpha}$ -Atom der aktivierten Aminosäure, also eine Konfigurationsumkehr und damit der Verlust der chiralen Integrität, die eine weitere mögliche Nebenreaktion basenkatalysierter Kupplungsreaktionen darstellt, ist durch die Bildung des Benzotriazol-Aktivesters selbst annähernd auszuschließen.<sup>[473]</sup> Dieser ist im Vergleich zum *O*-Acylisoharnstoff, der ohne Additive zu Racematen reagieren würde, weniger reaktiv. Eine direkte Deprotonierung und vermehrte Enolbildung bleibt damit aus.



**Abbildung 41:** Bildung eines symmetrischen Anhydrids, von Diazetidin, eines *N*-Carboxyanhydrids, eines *N*-Acylharnstoffs, eines Guanidins und Harnstoffs als mögliche Nebenreaktionen bei der EDC-Kupplung

Die aufgeführten Nebenreaktionen können nur vage als Erklärung für die zwischen 20% und 83% liegenden Ausbeuten angeführt werden. Im Falle der 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Derivate **Schl-33.086** und **Schl-33.087** (Tab. 4) sind diese (Boc-Prolin = 36%; Dimethylglycin = 41%) vermutlich auch auf die gleichzeitige Bildung des Phenolesters **206** zurückzuführen, die

wissentlich in Kauf genommen wurde, um nach Möglichkeit eine asymmetrische Schutzgruppenstrategie und damit verbundene zusätzliche Syntheseschritte durch vorherige Schützung (PG = protecting group  $\neq$  Boc) des Piperazins (**207**) oder des Phenols (**208**) zu umgehen (Abb. 42). Dabei müsste die Schutzgruppe vor der Amidkupplung des Piperazins mit der Aminosäure oder der Entschützung des Dithiocarbamats mit 2-Hydroxybenzyl-Gruppe zum Amin-Hydrochlorid eingeführt werden.



**Abbildung 42:** Bildung eines Phenolesters als mögliche Nebenreaktion bei der EDC-Kupplung der Dithiocarbamate mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest und asymmetrische Schutzgruppenstrategie durch Schützung des Phenols oder des Piperazin-Restes

Die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte **197** sollte sich nach vollständigem Umsatz der Amin-Hydrochloride insofern einfach gestalten, als das gebildete Harnstoffderivat **205** in Dichlormethan unlöslich ist und aus der Reaktionslösung ausfällt. Überschüssiges Carbodiimid sollte in wässriger Lösung leicht unter Bildung von Harnstoff zu hydrolysieren sein. Das Entfernen von Rückständen an HOBt und der im Überschuss eingesetzten Carbonsäure sollte im basischen Milieu vorgenommen werden. Triethylamin sollte in saurer Lösung durch Extraktion abgetrennt werden können. Trotz all dieser Maßnahmen, auf die im weiteren Verlauf meistens verzichtet wurde, musste in allen Fällen eine säulenchromatische Reinigung vorgenommen werden. Für die Dimethylglycinamid-Derivate **Schl-33.020** und **Schl-33.087** wurde hierzu die präparative RP-HPLC (*reversed phase-high performance liquid chromatography*) genutzt, bei der eine unpolare stationäre Phase Verwendung findet und die Elutionskraft der mobilen Phase mit steigender Polarität sinkt. Da diese standardmäßig aus einem Laufmittelgemisch aus Wasser/Acetonitril und einem Zusatz von 0,1% Trifluoressigsäure besteht, wurden die basischen Aminogruppen der Aminosäuren letztlich protoniert und die Produkte fielen als TFA-Salze an. Die Boc-Prolin-Derivate wurden anschließend allesamt mittels 4 M HCl in Dioxan entschützt und in die Prolin-Hydrochloride überführt (**Schema 28**). Da diese im Falle von **Schl-33.113**, **Schl-33.176**, **Schl-33.791** und

**Schl-33.792** nicht aus der Lösung ausfielen, wurden sie durch Abdestillieren des Lösungsmittels erhalten. Die Reaktionsprodukte musste dann noch mittels präparativer HPLC gereinigt werden und wurden ebenso als TFA-Salze isoliert. Nachfolgend sind alle Reaktionsprodukte der Piperazinamide und deren erzielte Ausbeuten tabellarisch aufgeführt (**Tab. 4**).

**Tabelle 4:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten der Aminosäurekonjugate der Dithiocarbamate

<div style="text-align: center;"> <b>R =</b>   <b>R' =</b> </div>						
	Schl-33.	Ausbeute in%	Schl-33.	Ausbeute in%	Schl-33.	Ausbeute in%
	...033	69	...041	55 (A = Cl)	...020	44 (·TFA)
	...170	40	...176	24 (A = TFA)	...169	61
	...086	17	...113	10 (A = TFA)	...087	19 (·TFA)
	...783	8	...792	5 (A = TFA)	...184	12
	...024	46	...031	42 (A = Cl)	...032	30
	...785	48	...791	30 (A = TFA)	...780	41

Im Falle des Boc-Prolins konnte ein doppelter Signalsatz in den NMR-Spektren beobachtet werden. Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt, dass sich dieser einem *cis*- und einem *trans*-Isomer der urethanischen Schutzgruppe des Prolins zuordnen lässt, die im Verhältnis von etwa 1 : 1,5 auftraten (**Abb. 43+44**). Dieser Sachverhalt ist für das Prolin speziell, da sich die Freien Enthalpien von *cis*- und *trans*-Isomer (**209a+b**) nur geringfügig unterscheiden und nicht ausschließlich eine Konformation sterisch begünstigt wird.<sup>[474–476]</sup> Eine Umwandlung von der einen in die andere Form bedarf jedoch aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters einer

hohen Aktivierungsenergie (etwa 80 kJ/mol) und verläuft somit relativ langsam (10-100 s).<sup>[477,478]</sup>

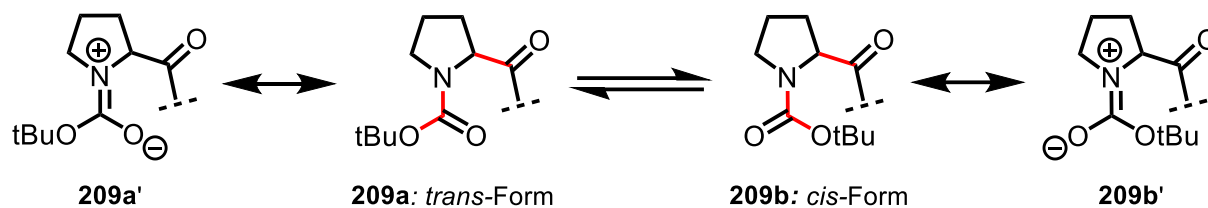


Abbildung 43: *cis-trans*-Isomerie beim Boc-Prolin sowie mesomere Grenzformeln

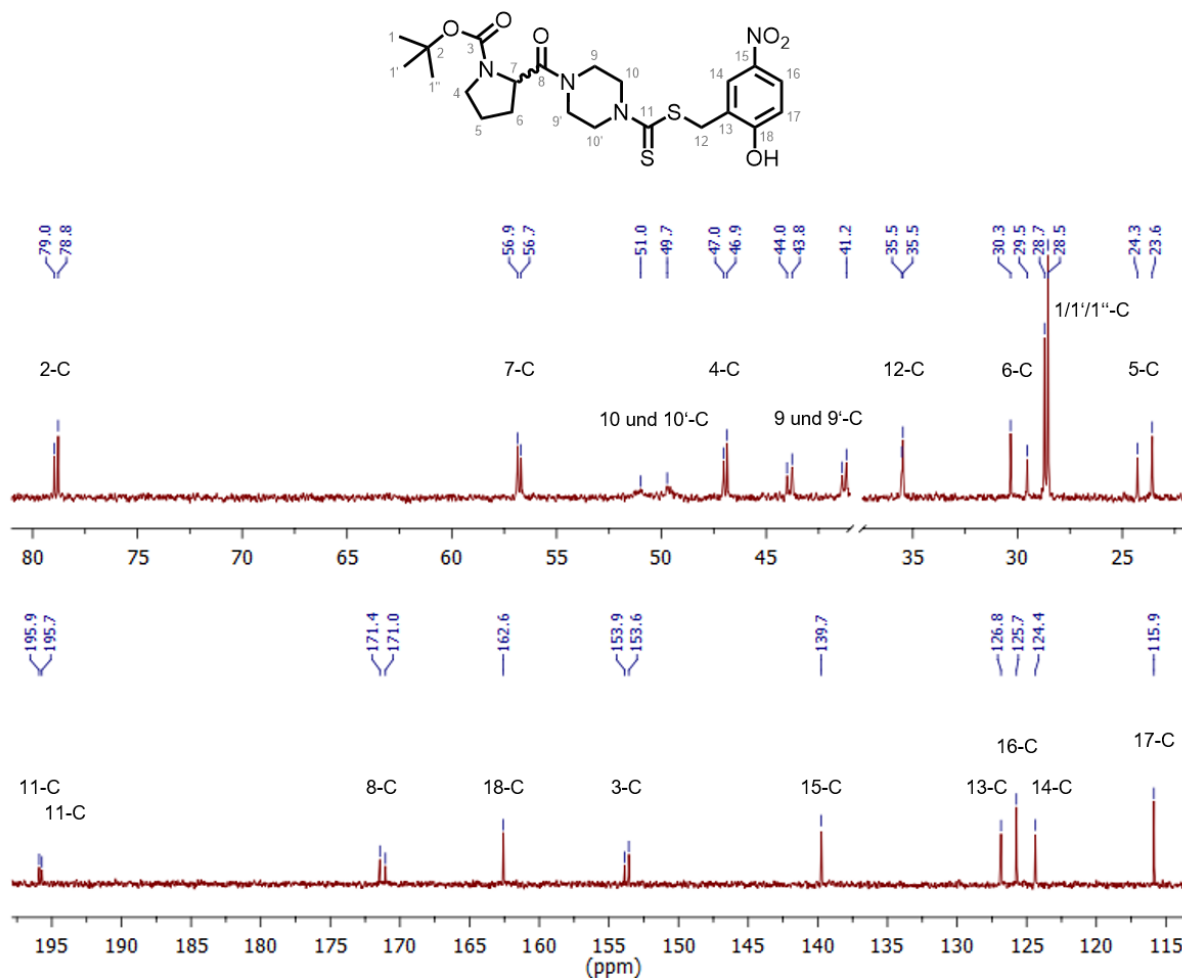
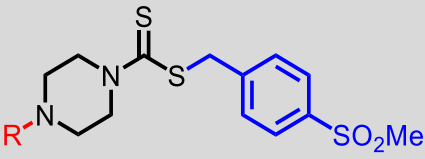
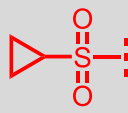
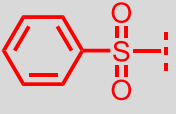
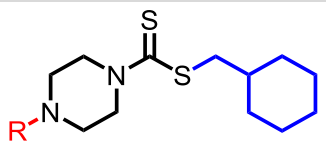
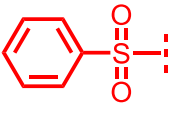
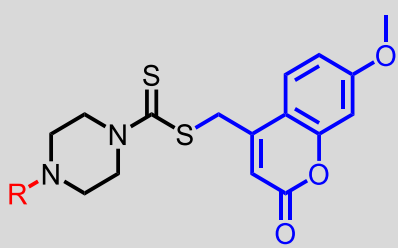

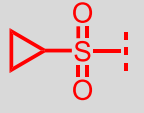
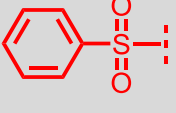
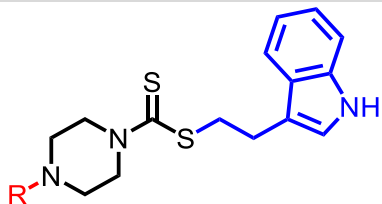
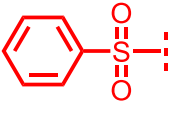


Abbildung 44: Bearbeitetes  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Schl-33.086 mit doppeltem Signalsatz (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

### ***In-vitro*-Testung der Dithiocarbamat-Derivate mit Sulfonamid-Teilstruktur**

*In vitro* führte der *N,N*-Dimethylsulfamoyl-Rest auf Seiten des Piperazin-Stickstoffs bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu ausschließlich inaktiven Derivaten. Dies trifft auch auf den *para*-Cyanbenzyl- und den 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest auf Seiten des einfach gebundenen Schwefelatoms des Dithiocarbamats zu. Insgesamt waren elf der zweiundvierzig Derivate der Kombinationsserie 1 aktiv. Davon besaßen sieben einen Sulfonyl- und nur vier einen Aminosäure-Rest. Während das Boc-Prolin ebenfalls inaktiv war, gab es immerhin noch zwei Derivate mit einem ungeschützten Prolin, die aktiv waren. Unter den Sulfonamiden war der Phenylsulfonyl-Rest viermal vertreten. Die Sulfonamide lassen sich hinsichtlich ihrer Aktivität in eine Reihenfolge bringen, die nachfolgend beschrieben wird (**Tab. 5**).

**Tabelle 5:** *Gerankte* Strukturen der aktiven Dithiocarbamate mit Sulfonamid-Teilstruktur bezüglich der antischistosomalen Wirkung (1 = am aktivsten; 7 = am wenigsten aktiv)

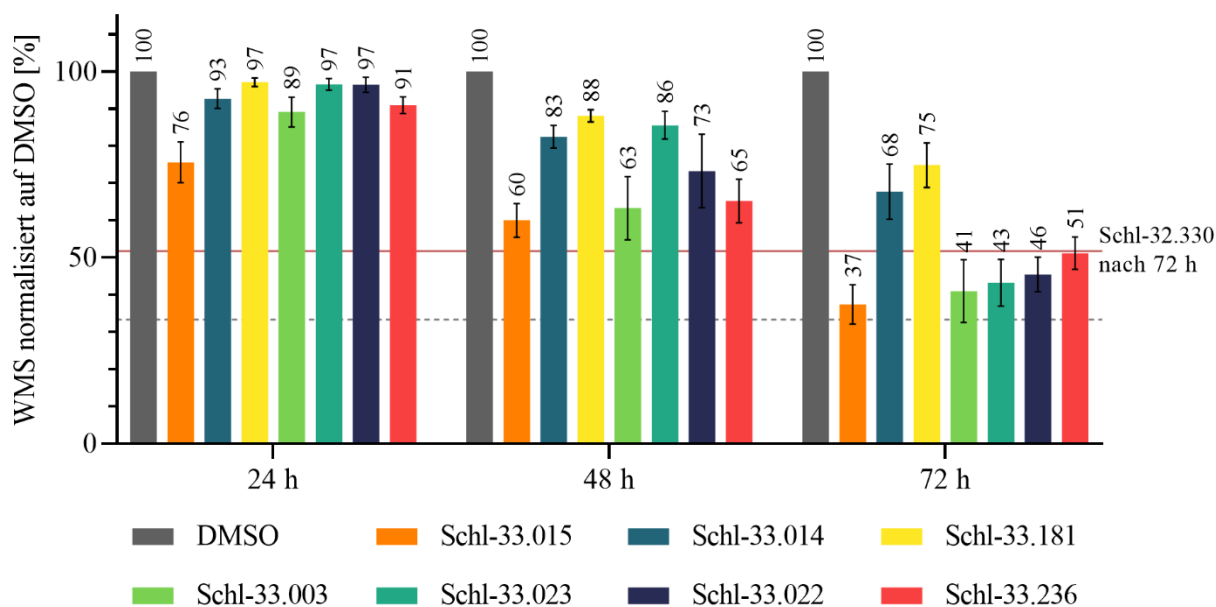
Strukturformel	Schl-33.	R =	Ranking
	...015		2
	...014		6
	...181		7
	...003		1
	...023		4
	...022		3
	...236		5

**Schl-33.181** mit einem Cyclohexylmethyl- und einem Phenylsulfonyl-Rest ist das am wenigsten aktive Derivat und führte nach 72 h zu einer etwa 25%-igen Reduktion der Motilität sowie zu einer 60%-igen Entpaarung (**Abb. 46**). Vereinzelt war es für schwache Darmdilatationen an den Weibchen ursächlich (**Abb. 45**). Es folgt **Schl-33.014**, bei dem der Cyclohexylmethyl-Rest gegen einen *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest ausgetauscht ist und das nach 72 h zu einer etwa 30%-igen Reduktion der Motilität, einer 60%-igen Entpaarung und mit zum Schluss nur 40 Eiern in 24 h zu einer Reduktion der Eizahl führte (**Abb. 47**). Weiterhin traten schwache Darmdilatationen an Männchen und Weibchen auf. **Schl-33.236** mit einem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest anstelle des *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Restes zeigte bereits nach 48 h eine antischistosomale Wirkung. Nach 72 h waren die Eiproduktion und Paarungsstabilität vollständig gestört. Die Motilität ging um bis zu 50% zurück. Auch löste dieses Derivat starke Tegumentschäden in Form von Warzenbildung aus. Die nächsten beiden Derivate innerhalb der Reihe trugen einen (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest. **Schl-33.023** mit einem Cyclopropylsulfonyl-Rest und **Schl-33.022** mit einem Phenylsulfonyl-Rest waren ähnlich aktiv bezüglich der Reduktion der Motilität. Diese wurde in 72 h um etwa 55% reduziert. Hinsichtlich der Paarungsstabilität und Eiproduktion war das Cyclopropyl-Derivat jedoch um die Hälfte beziehungsweise ein Drittel weniger aktiv als das Phenyl-Derivat. Beide führten zu starken Darmdilatationen und schwachen Tegumentschäden. Etwas schwächer in der Ausprägung von Phänotypen war **Schl-33.015** mit einem Cyclopropylsulfonyl- und einem *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest. Es führte im Schnitt zu mittleren Darmdilatationen und Schäden am Tegument mit schwacher bis mittlerer Ausprägung. Es reduzierte jedoch die Motilität um bis zu 65%. Zudem waren bis auf ein Wurmpaar alle anderen entpaart und die Eizahl lag nach 72 h bei 15 Stück oder weniger. **Schl-33.003** mit einem Methylsulfonyl- und einem (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest war in der Summe noch etwas stärker aktiv. Die Motilität wurde hier über 72 h um etwa 60% reduziert. Vereinzelt gab es auch letale Effekte, die jedoch nicht in jeder Testung beobachtet wurden. Über 72 h kam es annähernd zur vollständigen Entpaarung. Die Eizahl ging nach 72 h auf etwa 30 Eier pro 24 h zurück. Neben starken Dilatationen des Darmtraktes konnten auch massive Tegumentschäden (inklusive Ablösungen des Teguments) beobachtet werden.

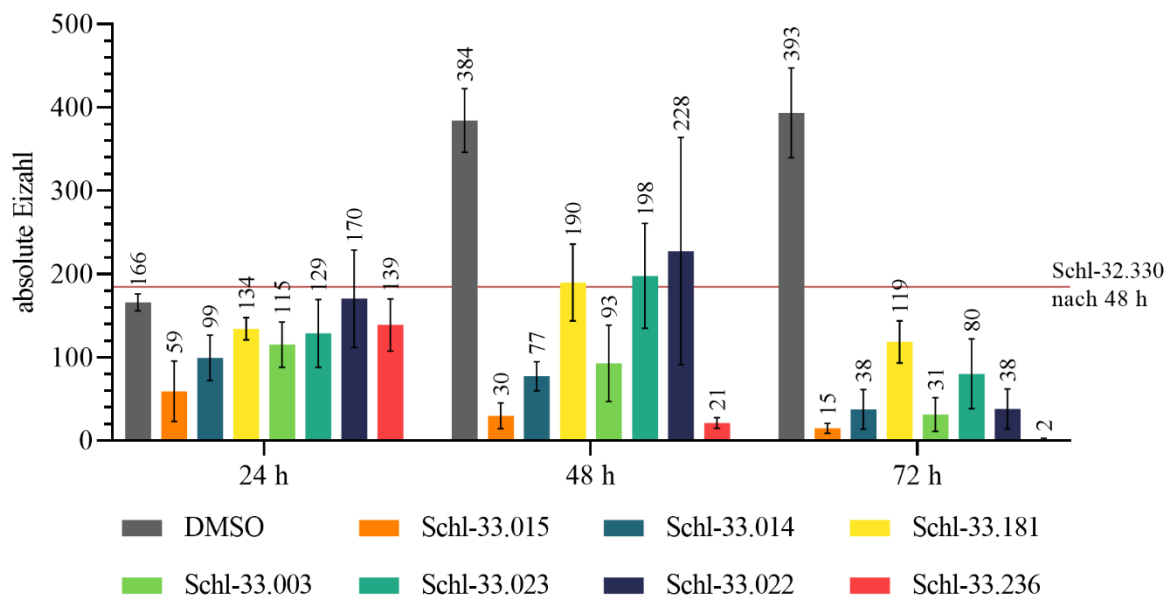




**Abbildung 45:** Exemplarische Phänotypen der Sulfonamide der Kombinationsserie 1 nach 72 h bei 10 µM; **Schl-33.003/022/015** (oben): Männchen mit Tegumentschäden/Tegumentablösung, vereinzelt ödematös aufgequollen, bei **Schl-33.022** zusätzlich auch Darmdilataationen; **Schl-33.003/022/181** (unten): Weibchen mit Darmdilataationen (überwiegend schwer ausgeprägt und großflächig); Verlust jeglicher inneren Strukturen

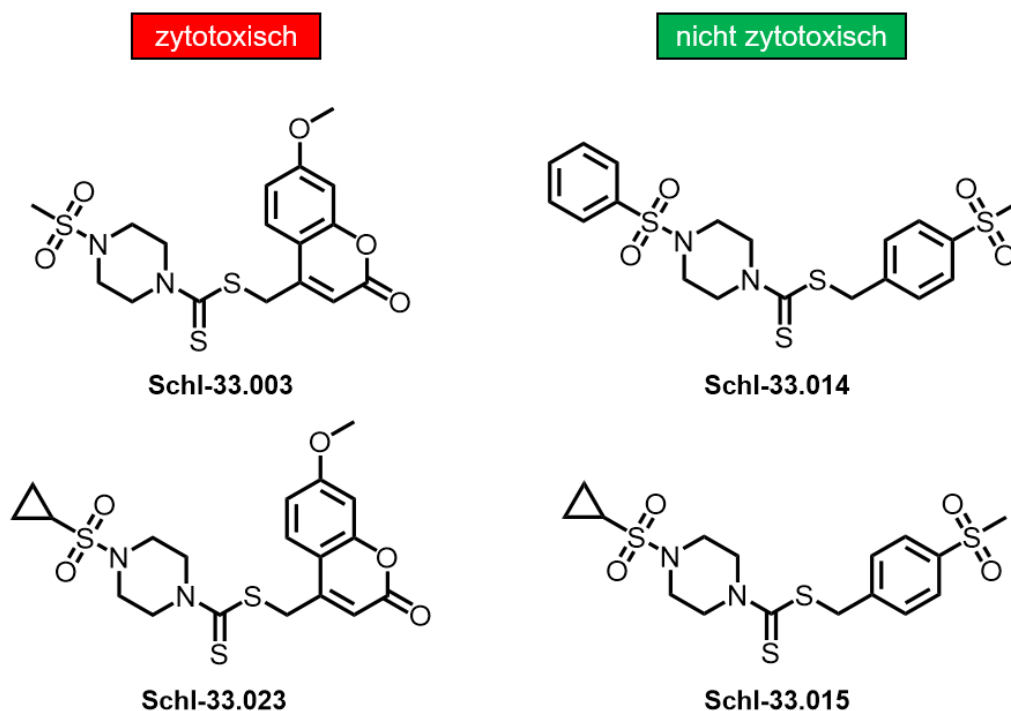


**Abbildung 46:** Vergleich der WMS-Daten von Dithiocarbamat-Derivaten gemäß **Tab. 5** nach verschiedenen Zeiten (10 µM / 24, 48, 72 h)



**Abbildung 47:** Vergleich der absoluten Eizahlen von Dithiocarbamat-Derivaten gemäß **Tab. 5** nach verschiedenen Zeiten (10  $\mu\text{M}$  / 24, 48, 72 h)

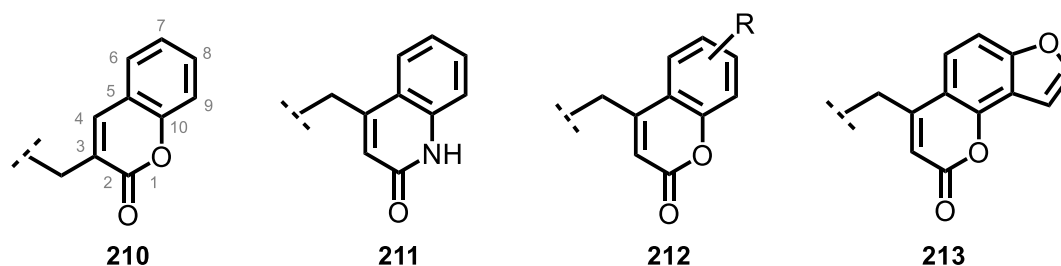
Von den antischistosomal aktiven Derivaten der Kombinationsserie 1 mit Sulfonamid-Teilstruktur waren bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nur die Verbindungen mit einem *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest **Schl-33.014** und **Schl-33.015** gegenüber der Zelllinie LS174T unauffällig (**Abb. 48**). Alle Derivate waren jedoch bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie zytotoxisch. **Schl-33.022**, **Schl-33.181** und **Schl-33.236** konnten nicht gemessen werden.



**Abbildung 48:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.003/023** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.014/015** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie (ebenfalls zytotoxisch gegenüber der HepG2-Zelllinie ab 50  $\mu\text{M}$ )

Vergleicht man die aktiven Phenylsulfonamide mit variablem Substituenten auf Seiten des Schwefels dieser Studie mit dem Derivat **Schl-32.330** (**Abb. 55**), welches einen *para*-Nitrobenzyl-Rest trägt und das zu Vergleichszwecken wiederholt getestet wurde, so fällt auf, dass dieses etwa genauso aktiv ist wie **Schl-33.236** mit einem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest. Dies wird vor allem anhand der Motilitäten nach 72 h deutlich. Ein Blick auf die Eiproduktion nach 48 h offenbart, dass **Schl-32.330** hier jedoch etwas später wirksam wird. 21 Eier stehen 185 Eiern gegenüber. Das Derivat **Schl-33.014** mit dem *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest und das Derivat **Schl-33.181** mit dem Cyclohexylmethyl-Rest hingegen waren beide weniger aktiv als **Schl-32.330**, was die Reduktion der Motilitäten nach 72 h wiederum gut verdeutlichen, die sich um etwa 15% beziehungsweise um etwa 25% von diesem unterscheiden. Dies steht im Widerspruch zu der Eizahl unter Behandlung mit **Schl-33.014** nach 48 h, die gegenüber **Schl-32.330** um etwa 60% stärker zurückgegangen ist. Die Eizahl unter **Schl-33.181** ist jedoch der von **Schl-32.330** sehr ähnlich. **Schl-33.022** mit dem (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest ist das einzige Derivat dieser Testreihe, das etwas besser wirksam als das entsprechende *para*-Nitrobenzyl-Derivat ist. Die Motilität nach 72 h ist hier um etwa 5% stärker reduziert. Es bleibt festzustellen, dass aufgrund der aktuellen Testergebnisse - weitere Vergleiche sind aufgrund der Datenlage nicht möglich - der (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest und der 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest einen adäquaten Ersatz für den *para*-Nitrobenzyl-Rest darstellen.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte gute Wirksamkeit der Cumarin-Derivate ist übereinstimmend mit der Literatur.<sup>[479-481]</sup> Dort finden sich verschiedene Derivate mit Cumarin-Teilgerüst, die selbst im Mausmodell aktiv waren. Der Cumarin-Rest wirkt dabei möglicherweise durch kovalente Enzyminhibition unter Öffnung des Lactons. Ein Dithiocarbamat beinhalten alle publizierten Derivate aber nicht. Hier bieten sich weitere Strukturmodifikationen wie etwa die Verlegung des Linkers von der 4- in die 3-Position (**210**), der Austausch des Lactons gegen ein Lactam (**211**), die Substitution des 6-Ring-Aromaten (**212**) oder dessen Anellierung (**213**) gemäß **Abbildung 49**.



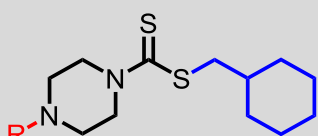
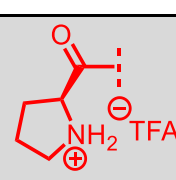
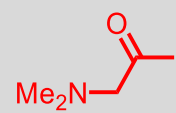
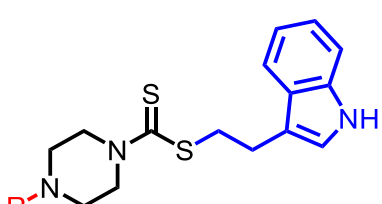
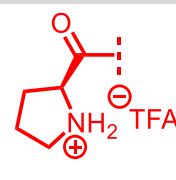
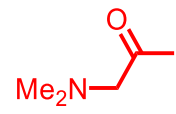
**Abbildung 49:** Mögliche Strukturmodifikationen des Cumarin-Teilgerüsts

Dabei ist jedoch die strukturelle Verwandtschaft der Cumarine zu den Flavonoiden zu bedenken, die promiskuitive Binder darstellen und für unspezifische Reaktionen bekannt sind. Ein prominentes Beispiel ist Quercetin.<sup>[482,483]</sup> Synthetisch wären jene Derivate aus einem Salicylaldehyd-Derivat und Essigsäureanhydrid über die *Perkinsche*-Synthese zugänglich, die nach dem Prinzip der Aldolkondensation abläuft und eng verwandt ist mit der *Knoevenagel*-Kondensation. Erste Versuche hierzu wurden bereits durchgeführt.

### ***In-vitro*-Testung der Dithiocarbamat-Derivate mit Aminosäure-Teilstruktur**

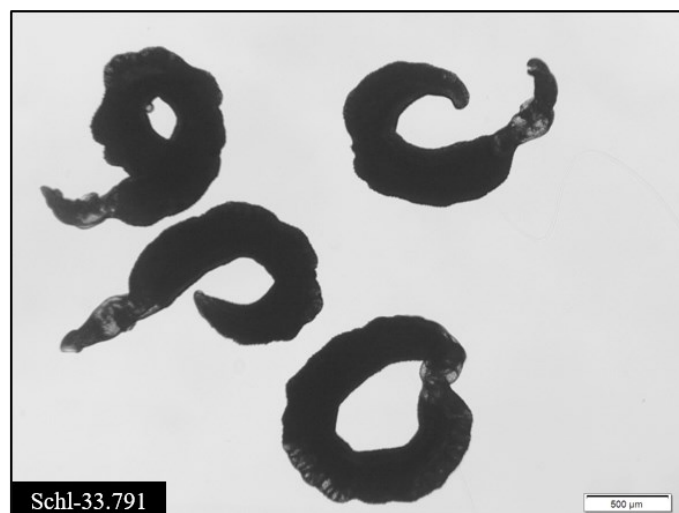
Von den Aminosäure-Derivaten waren auf Seiten des einfach gebundenen Schwefel-Atoms nur diejenigen mit einem Cyclohexylmethyl-Rest oder einem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest aktiv, wobei die *N,N*-Dimethylglycin-Derivate wiederum weniger aktiv als die Boc-entschützten Prolin-Derivate waren (**Tab. 6**).

**Tabelle 6:** *Gerankte* Strukturen der aktiven Dithiocarbamate mit Aminosäure-Teilstruktur bezüglich der antischistosomalen Wirkung (1 = am aktivsten; 4 = am wenigsten aktiv)

Strukturformel	Schl-33.	R =	Ranking
	...792		2
	...184		4
	...791		1
	...780		3

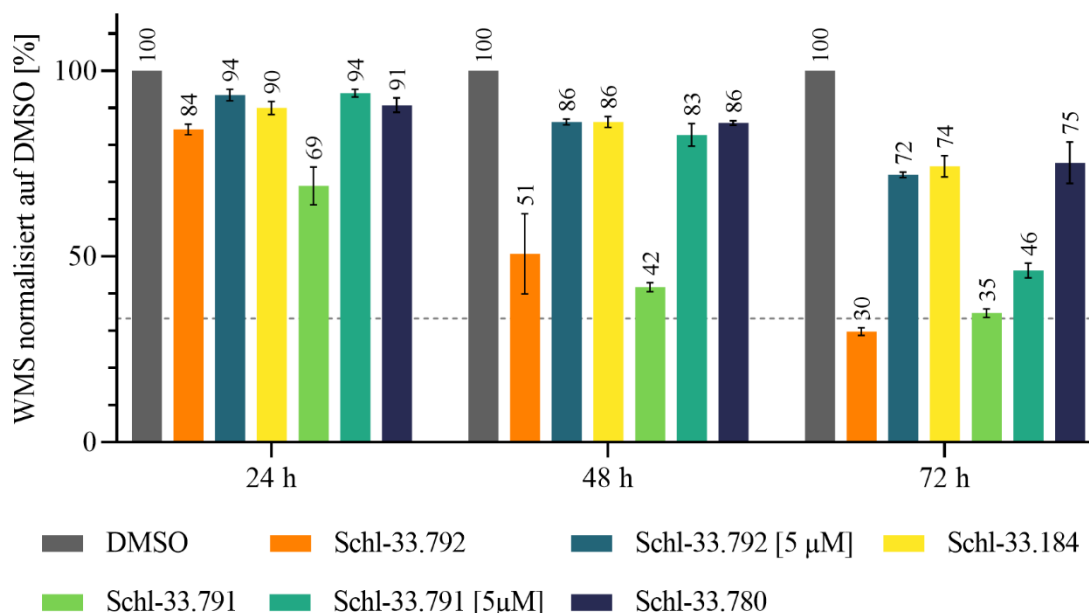
Dabei ist das *N,N*-Dimethylglycin-Derivat **Schl-33.780** mit dem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest stärker aktiv als **Schl-33.184** mit dem Cyclohexylmethyl-Rest. Beide führten nach 72 h zu einer etwa 70%-igen Entpaarung sowie einer 25%-igen Reduktion der Motilität (**Abb. 51**). Während **Schl-33.780** schwache Darmdilatationen und nach 72 h auch eine deutliche Inhibition der Eiproduktion verursachte, war **Schl-33.184** diesbezüglich absolut unauffällig (**Abb. 52**). Von den Prolin-Derivaten war **Schl-33.791** mit dem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest etwas aktiver als **Schl-33.792** mit dem Cyclohexylmethyl-Rest. Beide führten bereits nach 24 h zu einer

mindestens 80%-igen Entpaarung. Die Eiproduktion kam dann nach 48 h mit 15 Eiern oder weniger pro 24 h annähernd zum Erliegen. Die Motilität war bereits nach 48 h mit einer Reduktion von etwa 50% beziehungsweise 60% überaus deutlich beeinflusst. Das Cyclohexylmethyl-Derivat war zudem nach 72 h letal. Starke Darmdilatationen, vor allem an den Männchen, wurden wiederum nur bei **Schl-33.791** beobachtet (**Abb. 50**).

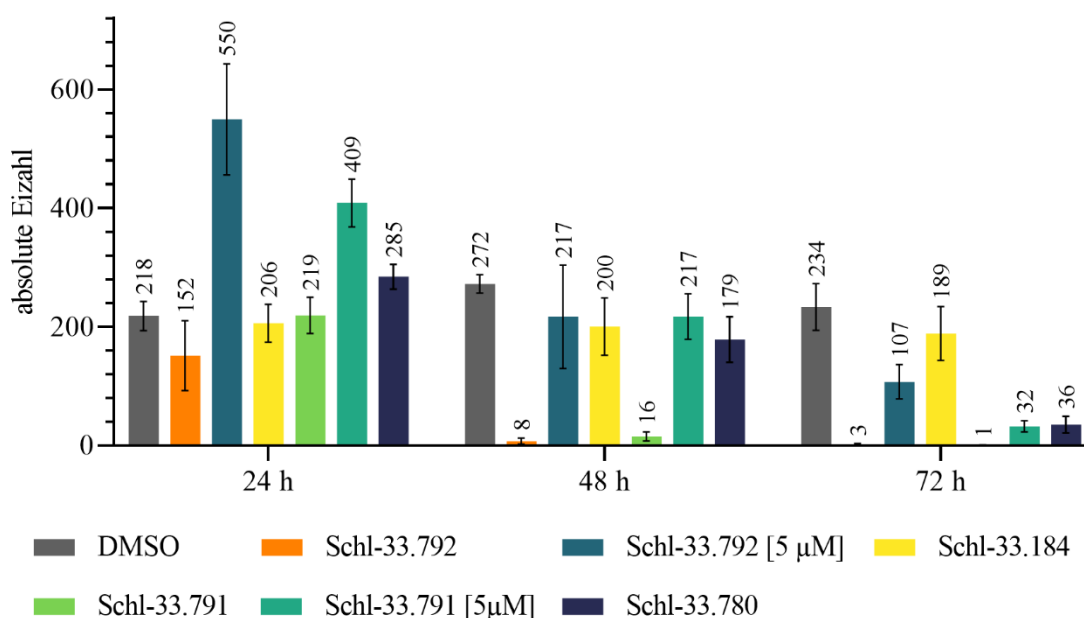


**Abbildung 50:** Darmdilatationen an den Männchen ausgelöst durch **Schl-33.791** nach 72 h bei 10 µM

Ab einer Konzentration von 5 µM verlor das Cyclohexylmethyl-Derivat drastisch an Aktivität. Die Motilität wurde über 72 h nur noch zu 30% reduziert, Darmdilatationen traten nur noch selten und dann schwach auf. Die Paarungsstabilität wurde jedoch weiterhin signifikant beeinflusst, bis zu einer Konzentration von 2 µM lag diese über 72 h hinweg im Schnitt bei 70%. Das 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Derivat zeigte auch bei 5 µM noch starke Darmdilatationen sowie nach 72 h eine 50%-ige Reduktion der Motilität, vollständige Entpaarung aller Würmer und eine Reduktion der Eiproduktion auf weniger als 35 Stück. Auch bei 4 µM wurden über 72 h noch 90% der Paare getrennt. Zusätzlich wurde die Motilität um 30% reduziert und es wurden mit 80 Eiern immer noch signifikant weniger Eier pro 24 h gelegt. Darmdilatationen waren vereinzelt sehr schwach ausgeprägt. Ab 3 µM wirkte **Schl-33.791** dann nicht mehr.



**Abbildung 51:** Vergleich der WMS-Daten von Dithiocarbamat-Derivaten gemäß **Tab. 6** nach verschiedenen Zeiten (5 und 10 µM / 24, 48, 72 h)

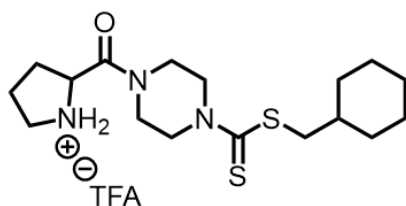


**Abbildung 52:** Vergleich der absoluten Eizahlen von Dithiocarbamat-Derivaten gemäß **Tab. 6** nach verschiedenen Zeiten (5 und 10 µM / 24, 48, 72 h)

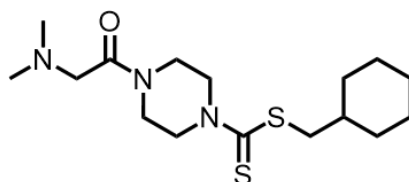
Von den Derivaten mit Aminosäure-Teilgerüst war das *N,N*-Dimethylglycin-Derivat **Schl-33.780** das einzige, dass bei 50 µM nicht zytotoxisch auf die verwendete LS174T-Zelllinie wirkte (**Abb. 53**). Es zeigte sich aber, dass alle vier antischistosomal aktiven Verbindungen bereits bei einer Konzentration von 50 µM, ein zytotoxisches Potential gegenüber der HepG2-Zelllinie aufwiesen.

zytotoxisch

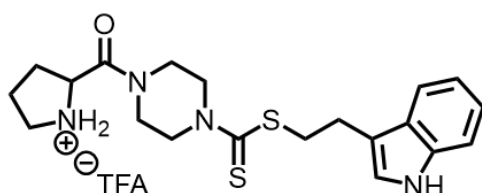
nicht zytotoxisch



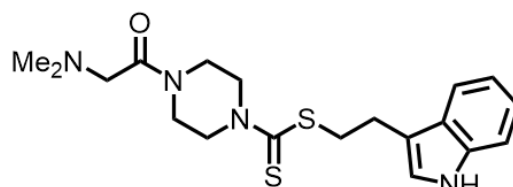
Schl-33.792



Schl-33.184



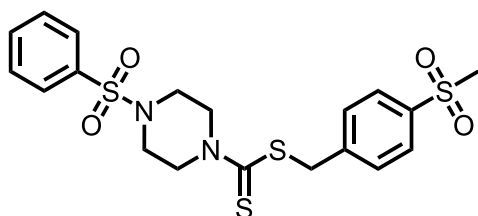
Schl-33.791



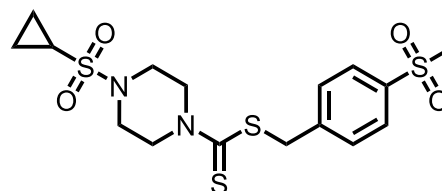
Schl-33.780

**Abbildung 53:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.792/184/791** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2- sowie der LS174T-Zelllinie und von **Schl-33.780** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie (ebenfalls zytotoxisch gegenüber der HepG2-Zelllinie ab 50  $\mu\text{M}$ )

Zusammenfassend lässt sich damit festhalten, dass **Schl-33.014** und **Schl-33.015** die einzigen Verbindungen aus der Kombinationsserie 1 waren, die sowohl bei 10  $\mu\text{M}$  eine antischistosomale Wirkung gegenüber *S. mansoni* zeigten und zugleich nicht zytotoxisch bis 100  $\mu\text{M}$  zumindest gegenüber der LS174T-Zelllinie waren. Dabei war **Schl-33.015** deutlich aktiver als **Schl-33.014**.



**Schl-33.014** [10  $\mu\text{M}$ ]



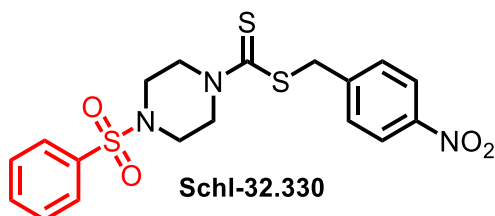
**Schl-33.015** [10  $\mu\text{M}$ ]

**Abbildung 54:** Strukturformeln der wirksamsten und bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxischen Derivate der Kombinationsserie 1 und deren jeweils niedrig wirksamste Konzentration

### 3.3 Sulfonamide

#### 3.3.1 Phenylsulfonamid-Derivate mit einem Substituenten in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position

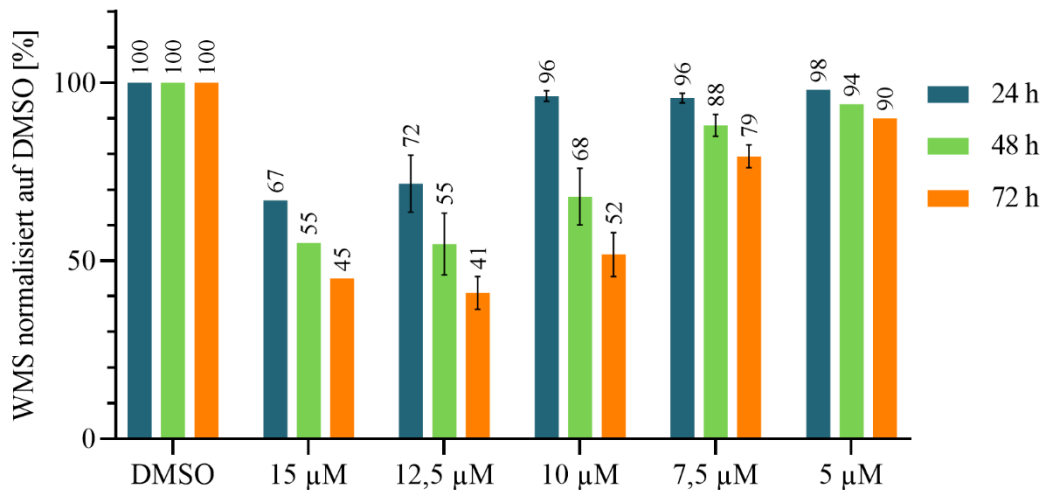
In der Arbeit von P. MÄDER wurde durch die Einführung einer Sulfonylgruppe in 4-Position des Piperazin-Rings eine deutliche Aktivitätssteigerung erreicht.<sup>[286]</sup> Das Phenylsulfonamid **Schl-32.330** wurde als eine Verbindung mit sehr guter antischistosomaler Aktivität und vielversprechenden Phänotypen vorgestellt, die jedoch bei 100  $\mu\text{M}$  sowohl gegenüber der HepG2- als auch der LS174T-Zelllinie zytotoxisch war. Deshalb sollte jene Verbindung im Weiteren nun umfassend optimiert werden.



**Abbildung 55:** Struktur des Phenylsulfonamid-Derivates als Ausgangspunkt für die weitere Strukturoptimierung

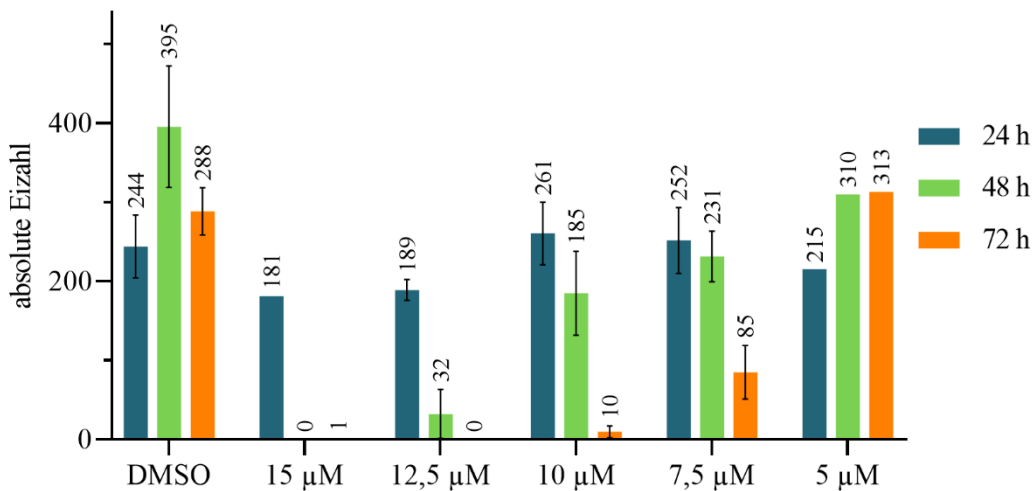
Hierzu wurde versucht, eine möglichst umfassende Reihe an Substituenten mit unterschiedlichen elektronischen und sterischen Eigenschaften in der 2-, 3- und 4-Position des aromatischen Rings einzuführen. So lassen sich im Idealfall neben Aussagen zur räumlichen Gestalt einer möglichen Bindungstasche auch Aussagen über etwaige Wechselwirkungspartner innerhalb dieser treffen. Dazu zählen beispielsweise H-Brückenbindungspartner. Die Substitution des Aromaten mit elektronenziehenden/-schiebenden Gruppen hat aber auch Einfluss auf etwaige  $\pi$ -Wechselwirkungen. Das Phenylsulfonamid könnte demnach beispielsweise mit den aromatischen Seitenketten eines Phenylalanins und Tyrosins, aber auch eines Histidins oder Tryptophans wechselwirken. Dabei ordnen sich die Aromaten entweder T-förmig (*edge to face*) oder versetzt zueinander gestapelt (*face to face*) an, wobei elektronenreiche Aromaten bevorzugt mit elektronenarmen Aromaten interagieren. Die Substituenten haben zum einen Einfluss auf die geometrische Anordnung der  $\pi$ -Systeme zueinander, zum anderen aber auch auf die Stärke der Wechselwirkung. Um frühere Ergebnisse zu validieren und etwaige Testergebnisse besser untereinander vergleichen zu können, wurde auch das unsubstituierte Phenylsulfonamid **Schl-32.330** nochmals dargestellt und *in vitro* getestet. Dabei zeigte das Phenylsulfonamid **Schl-32.330** eine gute antischistosomale Aktivität bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Nach 48 h sank die Motilität um etwa 30%. Nach 72 h beobachtete man insgesamt bis zu 50% Verringerung der Motilität. Ab einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  reichten 72 h lediglich noch für eine 20%ige Reduktion der Motilität aus (**Abb. 56**).





**Abbildung 56:** Abhängigkeit der WMS-Daten des Phenylsulfonamids **Schl-32.330** von der Konzentration bei verschiedenen Versuchszeiten (24, 48 und 72 h)

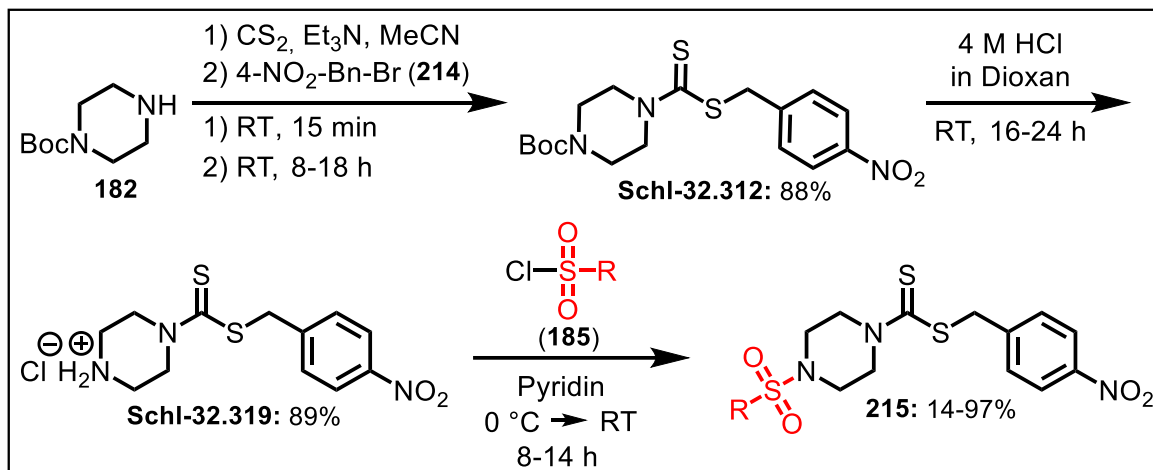
Die Eiproduktion bei einer Konzentration von 10 µM war über 72 h ebenfalls vermindert. So wurden im letzten Zeitintervall im Schnitt nur noch 10 Eier gezählt. Auch bei 7,5 µM war die Eiproduktion mit 85 Eiern noch schwach inhibiert (**Abb. 57**).



**Abbildung 57:** Absolute Eizahlen des Phenylsulfonamids **Schl-32.330** als Konzentrationsreihe nach 24, 48 und 72 Stunden

Die Paarungsstabilität hingegen wurde noch bis zu einer Konzentration von 5 µM beeinflusst. Bis zu 6 Paare waren hier im Schnitt entpaart. Auch Phänotypen in Form von schwachen Darmdilatationen traten über 72 h noch bis zu einer Konzentration von 7,5 µM auf. Stark ausgeprägt waren diese jedoch erst ab einer Konzentration zwischen 10 µM und 12,5 µM. Sie betrafen dann nicht nur die Weibchen und wurden zudem von Tegumentschäden in Form von Warzen begleitet. Die Beobachtungen hinsichtlich des Phenylsulfonamids sind im Großen und Ganzen zu denen von P. MÄDER konsistent.<sup>[286]</sup> Lediglich die Einschätzungen der Wirksamkeit weichen um den Faktor 2 voneinander ab. Während in der Arbeit von P. MÄDER eine ausgezeichnete Wirksamkeit bis zu 5 µM beobachtet wurde, trat diese hier erst ab 10 µM auf.

Zugriff auf alle Derivate war im Regelfall über die folgende Synthesesequenz möglich (**Schema 29**). An eine *one-pot*-Reaktion von Boc-Piperazin (**182**) mit Kohlenstoffdisulfid sowie 4-Nitrobenzylbromid (**214**) schloss sich eine saure Boc-Entschützung und basenkatalysierte Kondensationsreaktion mit den entsprechenden Sulfonsäurechloriden (**185**) an.

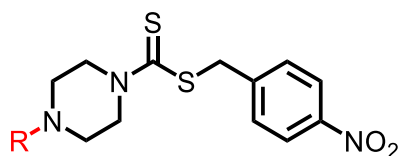


**Schema 29:** Allgemeine Synthesesequenz zur Darstellung von Sulfonsäureamid-Derivaten

### Methyl- und Trifluormethyl-Substituenten

Begonnen wurde mit der Einführung einer Methyl- sowie einer Trifluormethyl-Gruppe und damit einem *+I*- beziehungsweise *-I*-Substituenten. Die entsprechenden Derivate und Ausbeuten sind in **Tabelle 7** dargestellt. Mit Ausnahme des *para*-Toluol-Derivats **Schl-33.053** wurden alle Phenylsulfonamide mit einer Methyl- sowie einer Trifluormethyl-Gruppe in mittleren bis sehr guten Ausbeuten von 68-92% dargestellt.

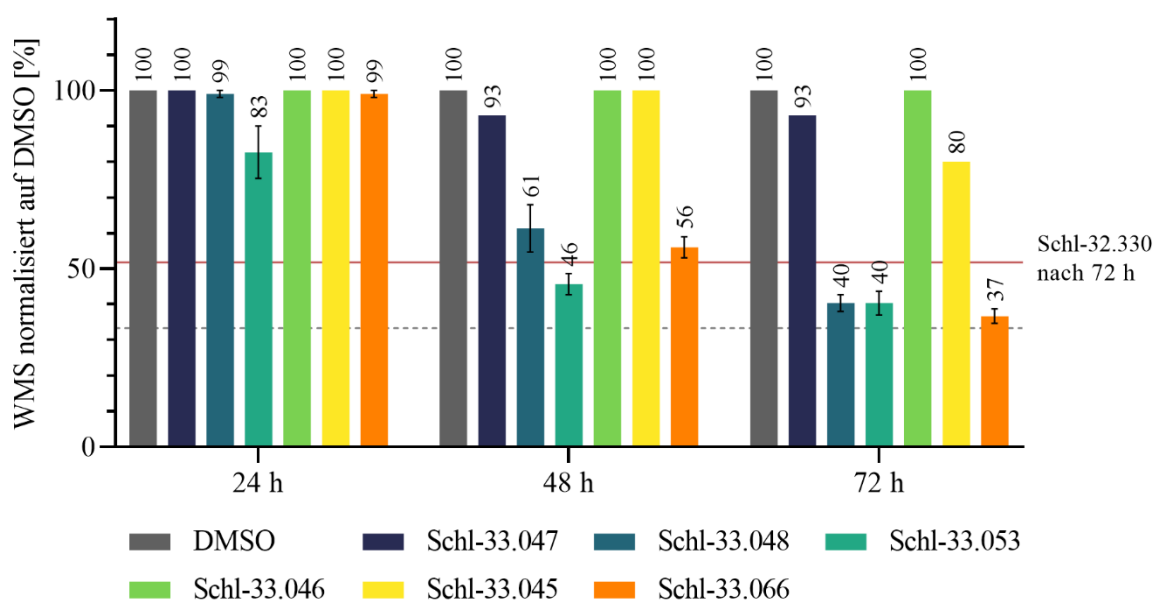
**Tabelle 7:** Strukturformeln und Ausbeuten der Phenylsulfonylpiperazin-Derivate mit  $\text{CH}_3$ - oder  $\text{CF}_3$ -Gruppe



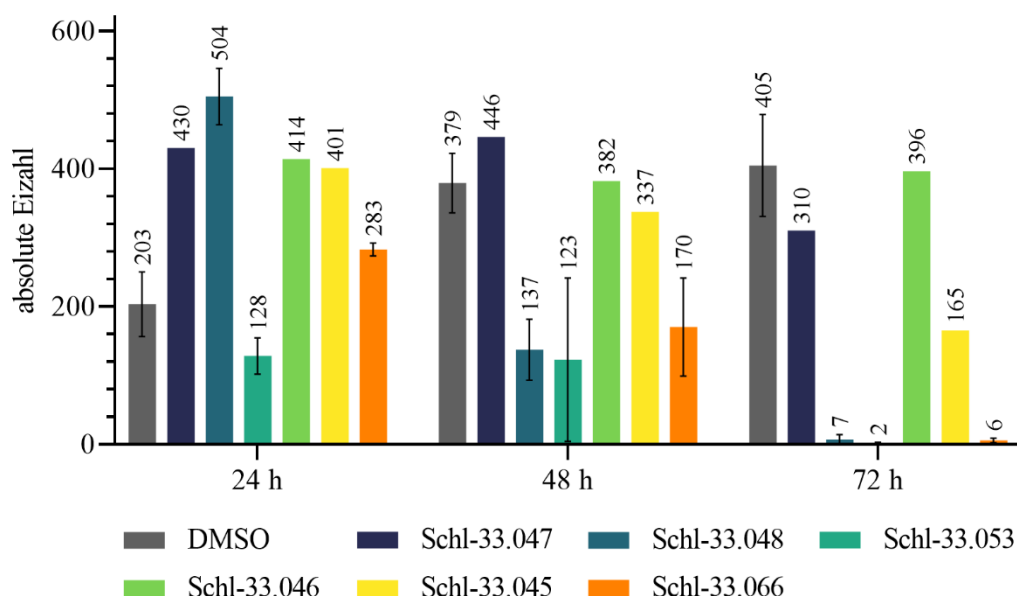
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
	78		68		28
<b>Schl-33.047</b>		<b>Schl-33.048</b>		<b>Schl-33.053</b>	
	79		92		91
<b>Schl-33.046</b>		<b>Schl-33.045</b>		<b>Schl-33.066</b>	

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigten im Falle der Methylgruppe das *meta*- (**Schl-33.048**) wie auch das *para*-substituierte Derivat **Schl-33.053** *in vitro* eine antischistosomale Aktivität. Die Eiproduktion wurde signifikant reduziert und kam nach 72 h annähernd gänzlich zum Erliegen, wobei ein merkbarer Wirkeintritt erst über 48 h hinaus zu beobachten war (**Abb. 59**). Auch die Motilität und das Paarungsverhalten wurden stark beeinflusst und zeigten nach 48 h erste Abweichungen von der Norm (**Abb. 58**). Während das *para*-substituierte gegenüber dem *meta*-substituierten Derivat am Anfang etwas besser wirkte (Effekte waren hier nach 48 h stärker ausgeprägt), glichen sich diese über den Zeitraum von 72 h an.

Im Falle der Trifluormethyl-Gruppe war die Wirksamkeit indessen ausschließlich auf das *para*-substituierte Derivat **Schl-33.066** beschränkt. Ein signifikanter Unterschied der beobachteten Parameter nach 72 h gegenüber den methylsubstituierten Derivaten bestand jedoch nicht. Auch der Wirkeintritt erfolgte leicht verzögert. Zudem zeigte sich, dass alle drei aktiven Verbindungen nach 48 h starke Darmdilatationen auslösten, die beim Trifluormethyl-Derivat etwas schwächer ausgeprägt waren. Stattdessen waren die ebenfalls auftretenden Tegumentschäden hier etwas stärker. Verglichen mit dem unsubstituierten Phenylsulfonamid **Schl-32.330** sind alle wirksamen Methyl- und Trifluormethyl-substituierten Verbindungen über 72 h aktiver, was vor allem anhand der Motilität sichtbar wird. Bereits ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte für alle zuvor aktiven Verbindungen keine antischistosomale Aktivität mehr nachgewiesen werden. Keiner der Parameter wurde mehr beeinflusst.

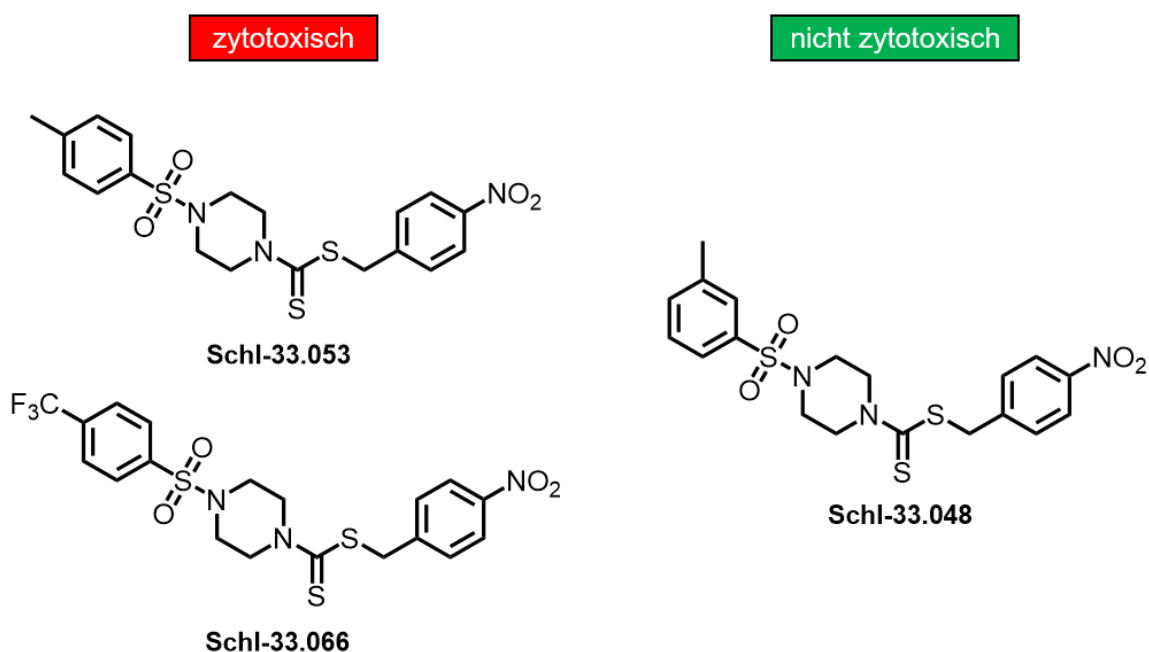


**Abbildung 58:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Methyl- bzw. Trifluormethyl-Substituent bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 59:** Vergleich der absoluten Eizahlen nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Methyl- bzw. Trifluormethyl-Substituent bei 10  $\mu$ M nach 24, 48 und 72 Stunden

**Schl-33.048** war die einzige Verbindung der antischistosomal aktiven Verbindungen mit einer Methyl- oder einer Trifluormethyl-Gruppe, die bei 100  $\mu$ M weder gegenüber der HepG2- noch der LS174T-Zelllinie zytotoxisch war (**Abb. 60**).



**Abbildung 60:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.053/066/048** bei 100  $\mu$ M gegenüber der HepG2-Zelllinie (**Schl-33.048** zusätzlich bei 100  $\mu$ M gegenüber der LS174T-Zelllinie)

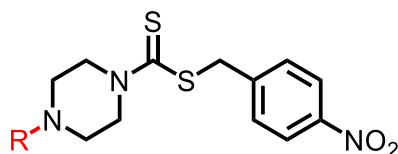
Die gezeigten Ergebnisse bei 10  $\mu$ M, die sowohl eine Toleranz gegenüber einer elektronenschiebenden als auch -ziehenden Gruppe insbesondere, in der 4-Position andeuten, lassen vermuten, dass der Einfluss der Funktionalisierung des aromatischen Rings auf die Wirkung nicht primär von elektronischen Effekten abhängt, sondern vielmehr sterische Effekte

eine entscheidende Rolle spielen. Diese Hypothese ist an dieser Stelle jedoch nicht ausreichend belegbar und gilt es durch weitere Versuche zu verifizieren.

### Methoxy- und Trifluormethoxy-Substituenten

Um den Einfluss elektronenschiebender sowie -ziehender Substituenten weiter zu untersuchen, wurden im Weiteren Derivate mit einer Methoxy- sowie einer Trifluormethoxy-Gruppe dargestellt, also mit sowohl  $+M$  als auch  $-I$ - Substituenten. Dabei überwiegt der positive mesomere Effekt den negativen induktiven Effekt ( $+M > -I$ ). Der Einfluss des induktiven Effekts ist im Falle der Trifluormethoxy-Gruppe jedoch größer als bei der Methoxy-Gruppe, sodass sich der  $+M$  und der  $-I$ -Effekt einander angleichen. Beide Substituenten sind zudem als Wasserstoffbrücken-Akzeptoren aktiv und wurden wiederum in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position des aromatischen Rings eingeführt. Die Ausbeuten sind **Tabelle 8** zu entnehmen.

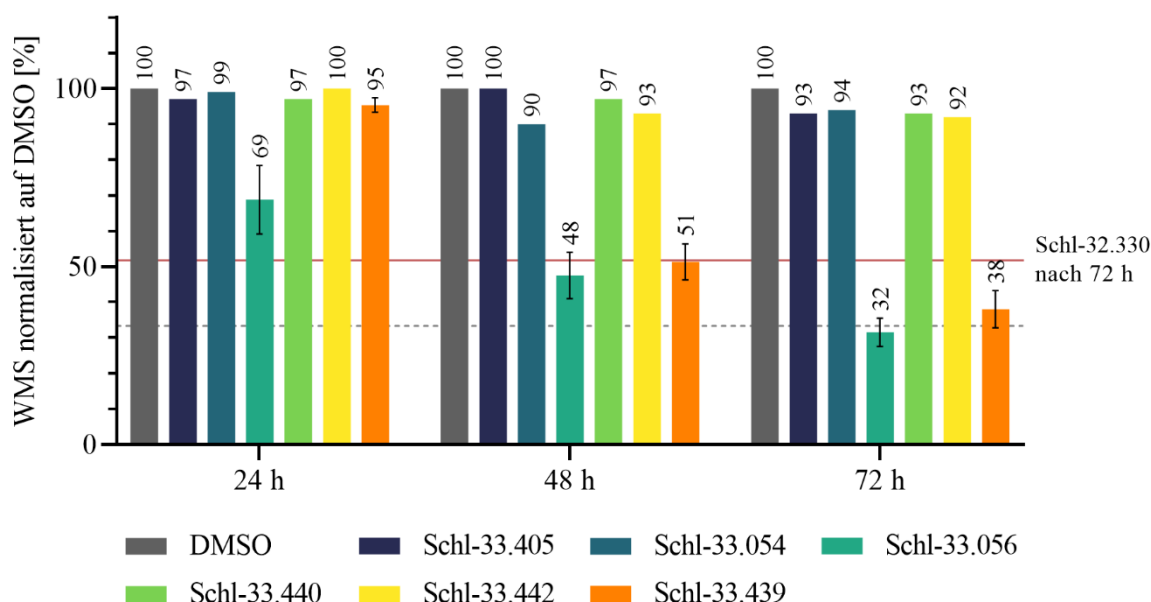
**Tabelle 8:** Strukturformeln und Ausbeuten der Phenylsulfonylpiperazin-Derivate mit  $\text{CH}_3\text{-O-}$  oder  $\text{CF}_3\text{-O-}$  Gruppe



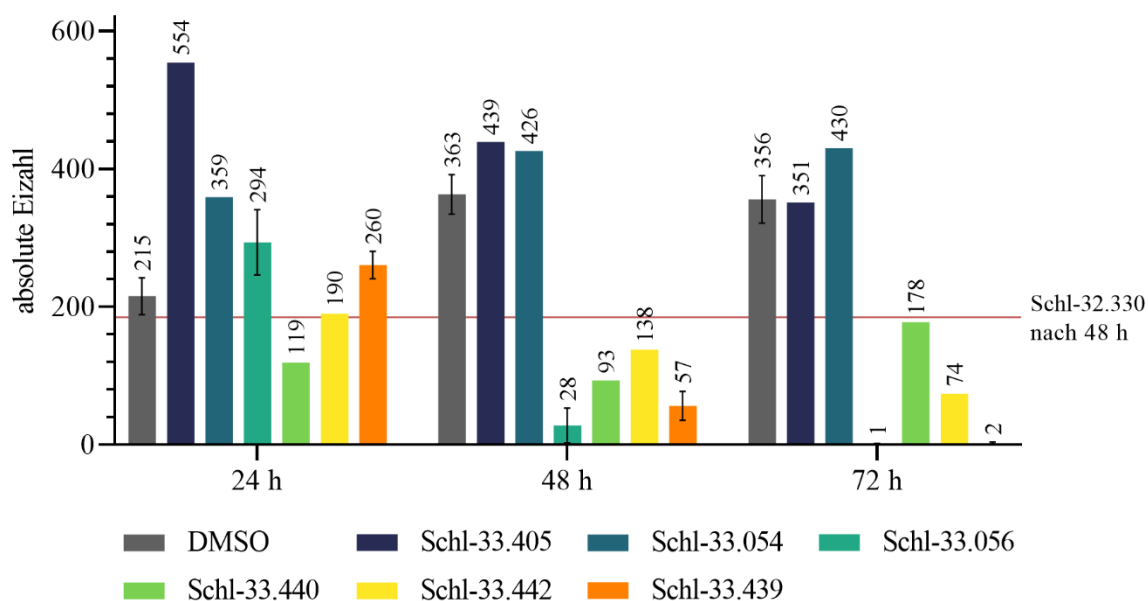
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.405	48	 Schl-33.440	62
 Schl-33.054	55	 Schl-33.442	64
 Schl-33.056	65	 Schl-33.439	43

Bei einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  zeigten mit Ausnahme des *meta*-Trifluormethoxy-Derivats **Schl-33.442**, das nach 72 h zu einer leicht verminderten Eizahl führte, ausschließlich die *para*-substituierten Verbindungen *in vitro* eine gute antischistosomale Aktivität. Neben der Eiproduktion waren wiederum auch die Motilität und Vitalität davon betroffen (**Abb. 61+62**). Während im Falle des Derivats **Schl-33.056** mit Methoxy-Gruppe in *para*-Position die Motilität

bereits nach 24 h erste Anzeichen hinsichtlich einer Reduktion zeigte, wurden die anderen Parameter erst nach 48 h deutlich beeinflusst. Das *para*-substituierte Trifluormethoxy-Derivat **Schl-33.439** wurde sogar erst nach 48 h aktiv. Nach 72 h glichen sich beide *para*-substituierten Derivate in ihrer Aktivität wiederum an, wobei das Methoxy- im Gegensatz zum Trifluormethoxy-Derivat einen schwachen letalen Effekt aufwies. Beim Trifluormethoxy-Derivat konnte dieser auch, jedoch nur für einzelne Testungen beobachtet werden. Beide Verbindungen zeigten nach 48 h zudem hochgradige Darmdilatationen und Tegumentschäden, wobei diese für das Methoxy-substituierte Derivat ebenfalls etwas deutlicher in Erscheinung traten. Auch das *para*-substituierte Methoxy- und Trifluormethoxy-Derivat waren somit aktiver als das unsubstituierte Phenylsulfonamid **Schl-32.330**. Neben der Motilität wird dies auch anhand eines Vergleichs der absoluten Eizahlen nach 48 h deutlich. Während das unsubstituierte Phenylsulfonamid zu jenem Zeitpunkt keinerlei Inhibition hinsichtlich der Eiproduktion zeigt, ist die Eiproduktion durch das Methoxy- und Trifluormethoxy-Derivat schon leicht inhibiert. Für keines der Derivate konnte eine antischistosomale Aktivität bei 5  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit scheint also auch in diesem Fall unabhängig von den elektronischen Eigenschaften der Derivate zu sein und sich auf die 4-Position zu beschränken, was den Anfangsverdacht der räumlichen Einflussnahme auf die Aktivität untermauert.

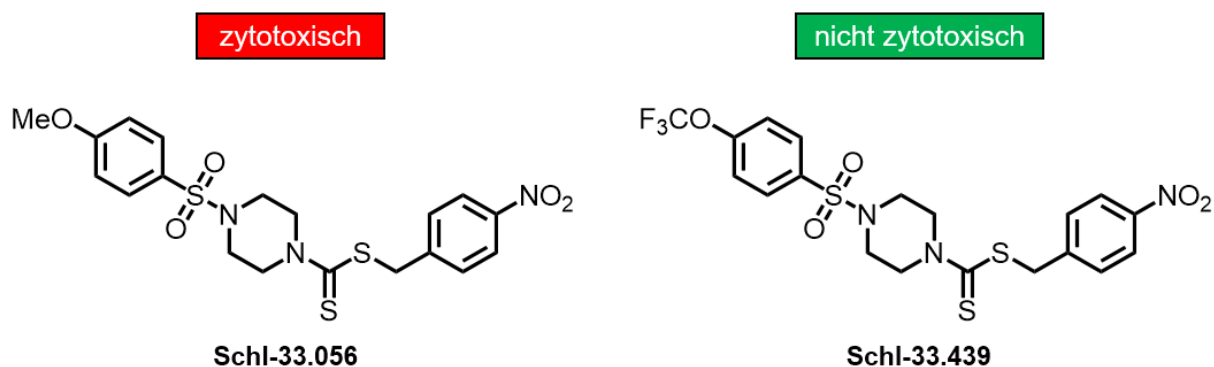


**Abbildung 61:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Methoxy- bzw. Trifluormethoxy-Substituent bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 62:** Vergleich der absoluten Eizahlen nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Methoxy- bzw. Trifluormethoxy-Substituent bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden

Von den Phenylsulfonamiden mit Methoxy- oder Trifluormethoxy-Gruppe war **Schl-33.439** die einzige Verbindung, welche zumindest bei 50  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch auf HepG2-Zellen wirkte (**Abb.63**).

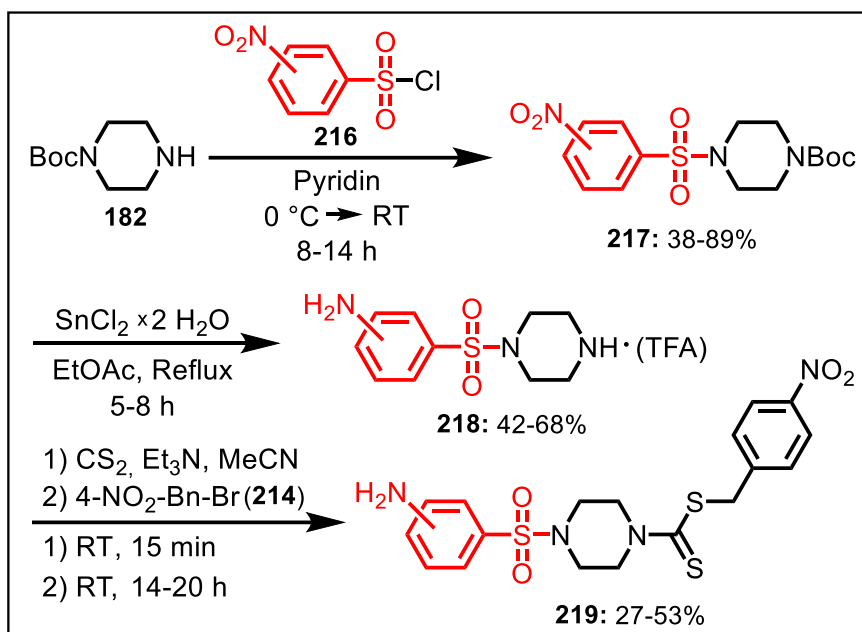


**Abbildung 63:** Zytotoxizität der Verbindung **Schl-33.056** bei 100  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.439** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie

**Amino- und Hydroxy-Substituenten**

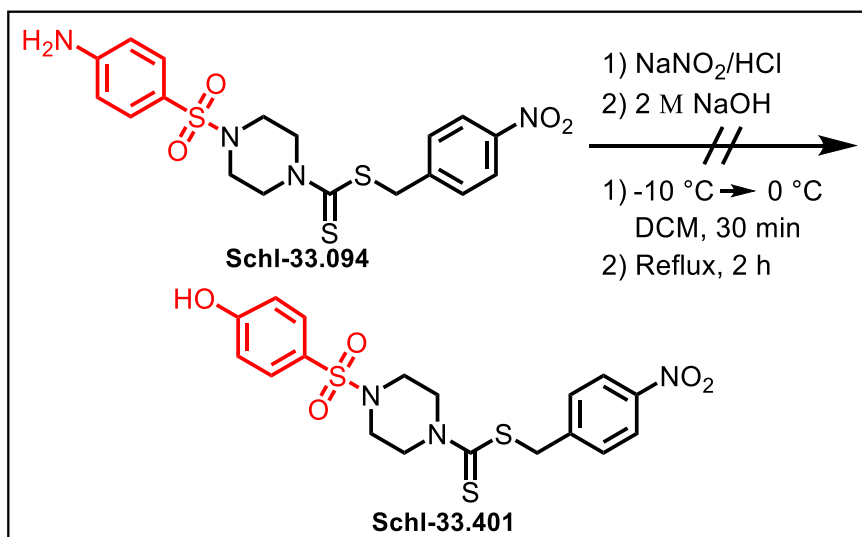
Im Folgenden wurde der aromatische Ring des Phenylsulfonamid-Derivates dann mit einer Amino- sowie einer Hydroxy-Gruppe versehen, also wiederum einem *-I-* als auch *+M*-Substituenten. Diese besitzen im Gegensatz zu den vorherigen Substituenten  $-\text{CH}_3$  ( $\text{clogP} = 2,65$ ),  $-\text{CF}_3$  ( $\text{clogP} = 3,15$ ) und  $-\text{OCF}_3$  ( $\text{clogP} = 3,40$ ) anstelle von hydrophoben, hydrophilere Eigenschaften ( $-\text{NH}_2$ :  $\text{clogP} = 1,62$ ;  $-\text{OH}$ :  $\text{clogP} = 1,96$ ) und sind vergleichbar mit  $-\text{OCH}_3$  ( $\text{clogP} = 2,23$ ). Zudem fungieren sie sowohl als Wasserstoffbrücken-Akzeptor als auch -Donor. Die Anilin-Derivate **219** wurden ausgehend von den Nitro-Phenylsulfonylpiperazin-Derivaten **217** durch Reduktion mit Zinn(II)-chlorid dargestellt (**Schema 30**). Boc-Piperazin (**182**) wurde dazu im ersten Schritt der Synthese mit einem Nitrophenylsulfonylchlorid (**216**) in Pyridin in das entsprechende Sulfonamid **217** überführt, welches weiterhin dann in Ethylacetat mit 5 Äquivalenten an Zinn(II)-chlorid-Dihydrat refluxiert wurde. Dabei wurde die Nitro-Gruppe über ein Nitroso- und Hydroxylamin-Derivat schließlich in die  $\text{NH}_2$ -substituierte aromatische Ammonium-Verbindung **218** überführt und Zinn(IV)-chlorid gebildet. Durch die salzsauren Bedingungen während der Reaktion wurde auch die Boc-Schutzgruppe gespalten und das Piperazin protoniert ( $\text{pK}_\text{S} = 9,8$ ). Eine gleichzeitige Protonierung des durch die Delokalisation des freien Elektronenpaares über den aromatischen Ring weniger basischen Anilins ( $\text{pK}_\text{S} = 4,6$ ) blieb indessen aus. Nach der Zugabe von dest.  $\text{H}_2\text{O}$  konnte das Zinn über Kieselgur abgetrennt werden. Das Filtrat wurde im Weiteren mit Natriumhydroxid versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit DCM/MeOH und  $\text{Et}_3\text{N}$  oder HPLC-Reinigung mit einem Gemisch aus  $\text{H}_2\text{O}$ , MeCN und TFA wurde das Produkt **218** entweder im ungeladenen Zustand oder als TFA-Salz erhalten. Nach abschließender Reaktion mit  $\text{CS}_2$  und Nitrobenzylbromid (**214**) konnten die Dithiocarbamate mit Aminophenylsulfonylpiperazin-Teilstruktur (**219**) isoliert werden. Die Kondensation der Sulfonsäurechloride **216** mit Boc-Piperazin (**182**) im ersten Schritt der Synthese machte vereinzelt insofern Probleme, als das resultierende Sulfonamid **217** nicht aus der Pyridin-haltigen Lösung durch die Zugabe von Wasser ausgefällt werden konnte, sondern mittels Extraktion mit salzsaurer Lösung und Dichlormethan von dieser abgetrennt werden musste. Auch die Reinigung der Reaktionsprodukte **218** nach Reduktion der Nitro-Gruppe war langwierig, da das Zinn die Poren der Fritte oft verstopfte. Um eine Reaktion des Kohlenstoffdisulfids mit dem primären aromatischen Amin zu vermeiden, wurde im Unterschied zu den vorherigen Synthesen nur ein geringer Überschuss von 1,1 eq anstelle von 2,0-3,0 eq an  $\text{CS}_2$  verwendet, was die Ausbeuten der Dithiocarbamate **219** im letzten Syntheseschritt von nur 27-53% erklären könnte.





**Schema 30:** Erfolgreich durchgeführte Synthese der Anilin-Derivate ausgehend von den entsprechenden Nitro-Phenylsulfonylpiperazinen durch Reduktion mit SnCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O

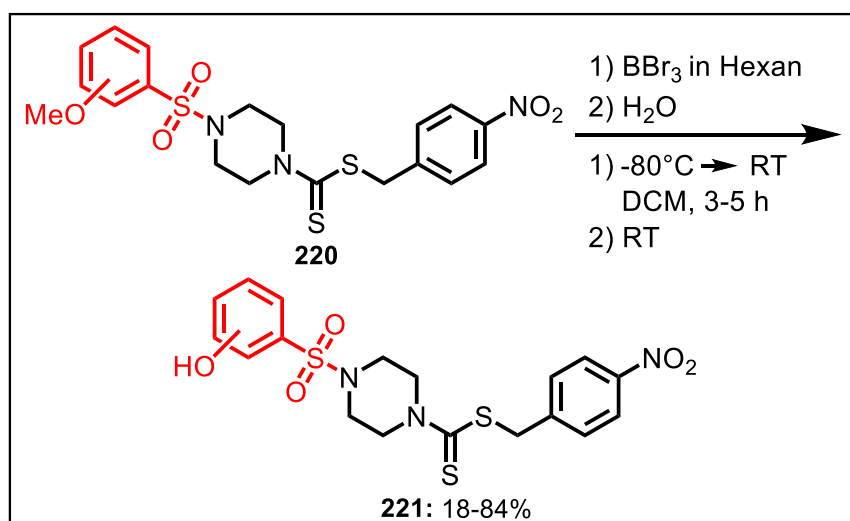
Bei den aromatischen Hydroxylderivaten wurde zunächst versucht, diese aus den Anilin-Derivaten mittels Diazotierung und anschließender Phenolverkochung des Diazonium-Kations zu erhalten (**Schema 31**). Dazu wurden Salzsäure und Natriumnitrit in wässriger Lösung vorgelegt und das dabei gebildete elektrophile Nitrosylkation zunächst mit dem *para*-Anilin-Derivat **Schl-33.094** bei einer Temperatur von 0 °C bis -10 °C umgesetzt. Es kam vermutlich zur Bildung eines Diazohydroxids, aus dem letztlich ein Diazonium-Salz entstand. Unter Hitzeeinwirkung sollte dieses dann in ein Phenylkation unter gleichzeitiger Bildung von N<sub>2</sub> zerfallen. Die Reaktion erfolgte in Gegenwart von Natriumhydroxid, sodass nach nucleophilem Angriff eines Hydroxid-Ions letztlich das Phenol-Derivat resultieren sollte.



**Schema 31:** Gescheiterte Darstellung der Phenol-Derivate ausgehend von den entsprechenden Anilin-Derivaten über die Diazotierung und darauffolgende Phenolverkochung des Diazonium-Kations

Das gewünschte Reaktionsprodukt **Schl-33.401** wurde jedoch nicht erhalten. Vermutlich erfolgte neben dem Angriff auf das Phenylkation eine nucleophile Substitutionsreaktion am Dithiocarbamat-Kohlenstoffatom durch  $\text{OH}^-$  unter Bildung der guten Abgangsgruppe *para*-Nitro-Benzylthiolat. Daneben entsteht die freie Monothiocarbamidsäure, die unter Bildung von Carbonylsulfid zerfällt. Auch eine Reaktion des Thiocarbonyl-Schwefelatoms mit  $\text{NO}^+$  oder eine Desulfurierung mit  $\text{NO}_2^-/\text{H}^+$ , wie diese von Rhodaninen bekannt ist, ist denkbar.<sup>[484]</sup>

Die Darstellung der Phenol-Derivate **221** gelang schließlich aus den entsprechenden Methyl-Phenolethern **220** (**Schema 32**). Dabei wurde die Methoxy-Gruppe mit der Lewissäure  $\text{BBr}_3$  bei  $-80^\circ\text{C}$  zur Reaktion gebracht und zur phenolischen OH-Gruppe gespalten. Die Demethylierung erfolgt über die Bildung eines Lewis-Säure-Base-Addukts, das anschließend unter Bildung eines Dibromboryloxonium-Kations und  $\text{Br}^-$  zerfällt. Letzteres greift den Methyl-Kohlenstoff nucleophil an. Es entstehen Methylbromid und ein Aryloxydibromboran, das im wässrigen Medium zum Phenol-Derivat **221** dissoziiert. Daneben werden Bromwasserstoff und Borsäure gebildet. Da außer dem Ethersauerstoff noch andere Molekülteile wie etwa die Nitro-Gruppe oder das Thiocarbonyl-Schwefelatom freie Elektronenpaare besitzen und somit als Elektronenpaar-Donatoren in Wechselwirkungen mit dem Bortribromid treten können, wurde ein deutlicher Überschuss an  $\text{BBr}_3$  eingesetzt. Theoretisch sollten alle als Nebenprodukte anfallenden Spaltprodukte wasserlöslich sein oder sich zumindest mit Wasser zu wasserlöslichen Produkten umsetzen und somit leicht von dem freien Phenol abtrennen lassen. Tatsächlich konnte das gewünschte Produkt **221** durch die Zugabe von Wasser ausgefällt und abgesaugt werden oder mit Dichlormethan durch Extraktion abgetrennt werden.

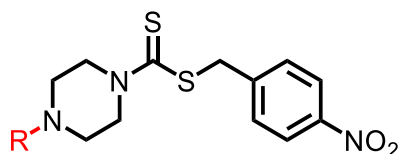


**Schema 32:** Erfolgreiche Synthese der Phenol-Derivate ausgehend von den entsprechenden Methyl-Phenol-Ethern über eine Etherspaltung mittels Lewissäure

Gegenüber klassischen Methoden, bei denen stark saure oder basische Konditionen herrschen müssen, ist diese Form der Etherspaltung eine vergleichsweise milde Methode, die moderate Ausbeuten erwarten lässt, was sich in der Realität mit 18% und 37% aber etwas anders abzeichnete und damit nur bedingt bestätigen ließ.

Die Strukturen der Anilin- (**219**) und Phenol-Derivate (**221**) samt ihrer Benennung und der jeweils erzielten Ausbeuten sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten der Phenylsulfonylpiperazin-Derivate mit NH<sub>2</sub>- und OH-Gruppe (\*Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



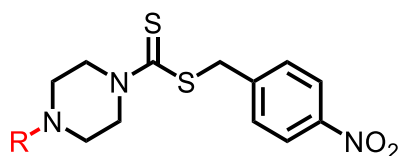
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
	7*		17*		22*
<b>Schl-33.095</b>		<b>Schl-33.092</b>		<b>Schl-33.094</b>	
	84		37		18
<b>Schl-33.485</b>		<b>Schl-33.423</b>		<b>Schl-33.401</b>	

Alle Verbindungen waren jedoch bei der getesteten Konzentration von 10 µM inaktiv. Ausschließlich das *para*-substituierte Phenol-Derivat **Schl-33.401** hatte einen schwachen Einfluss auf die Paarungsstabilität. Dies lässt vermuten, dass die zu einer potenziellen Bindungstasche ausgebildeten Wechselwirkungen an dieser Stelle keine Wasserstoffbrücken einschließt. Die Membrangängigkeit sollte weitestgehend gleich sein, da auch diese Moleküle bei physiologischem pH-Wert ungeladen sind. Wie den Testergebnissen zu entnehmen ist, führt eine oxidative Desalkylierung der Phenoether an dieser Stelle zu einem Verlust antischistosomaler Aktivität. Die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke, die insbesondere bei dem *ortho*-substituierten Anilin- und Phenol-Derivat denkbar wäre, wurde durch NMR-Messung nicht bestätigt.

### Fluor- und Chlor-Substituenten

Die Einführung der Substituenten Fluor und Chlor mit  $-I$ - und  $+M$ -Effekt (wobei  $-I > +M$ ) war der nächste logische Schritt bei der Optimierung des Phenylsulfonamid-Derivates. Mit Ausnahme des *meta*-Chlor-Derivats **Schl-33.064** konnten alle Verbindungen in guten Ausbeuten von 65-92% erhalten werden (**Tab. 10**).

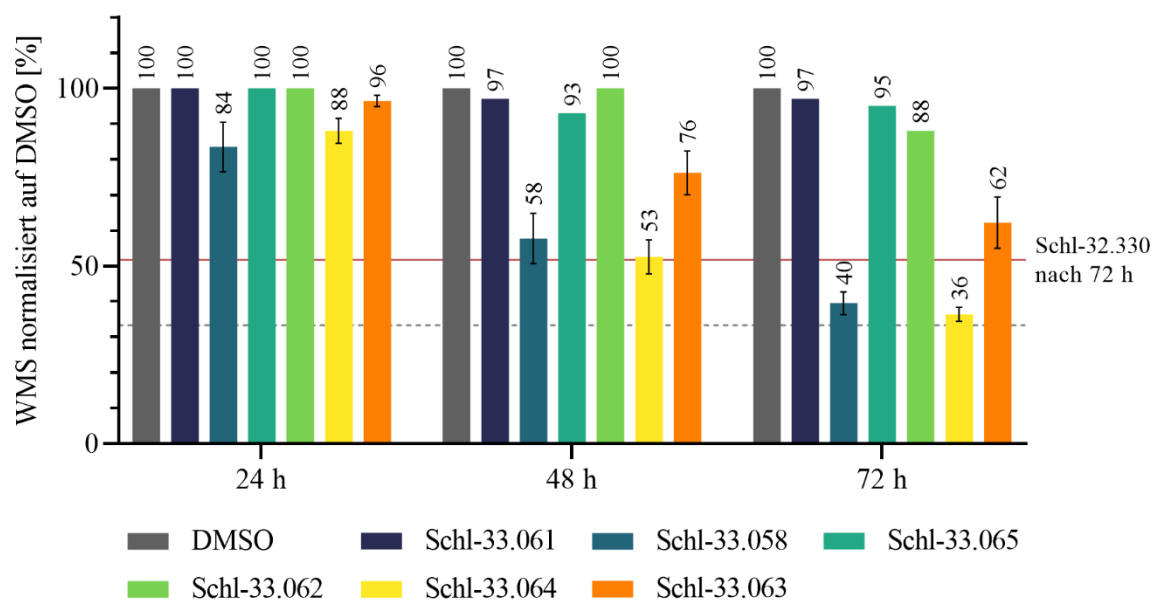
**Tabelle 10:** Strukturformeln und Ausbeuten der Phenylsulfonylpiperazin-Derivate mit F- und Cl-Substituenten



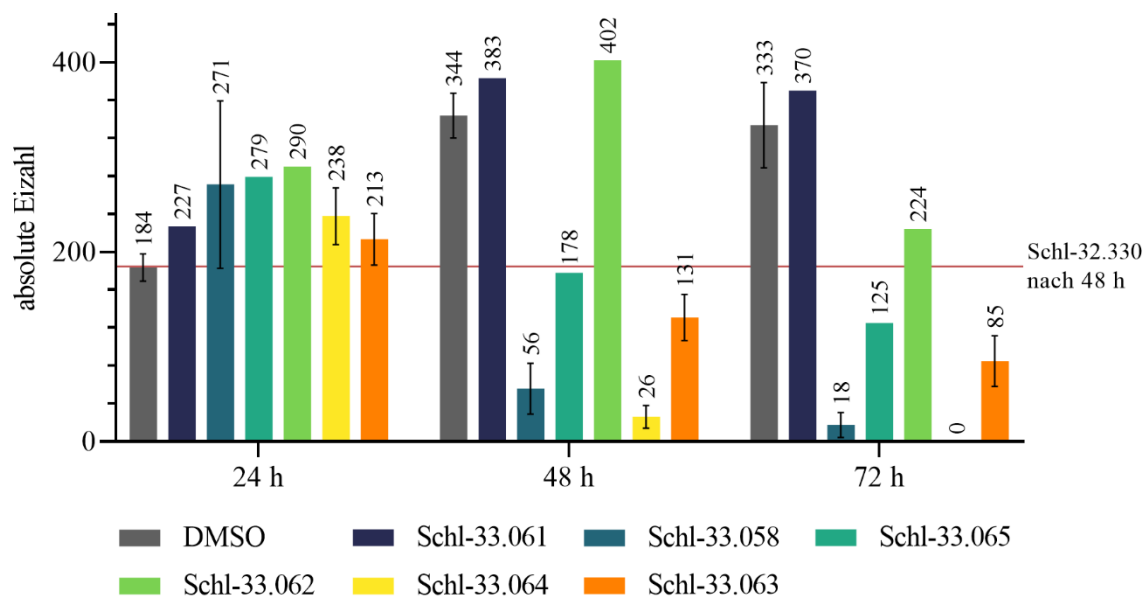
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
	87		85		81
<b>Schl-33.061</b>		<b>Schl-33.058</b>		<b>Schl-33.065</b>	
	65		38		92
<b>Schl-33.062</b>		<b>Schl-33.064</b>		<b>Schl-33.063</b>	

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigten nicht ausschließlich die *ortho*-substituierten Derivate **Schl-33.061** und **Schl-33.062** einen Verlust antischistosomaler Aktivität, sondern auch das *para*-Fluor-substituierte Derivate **Schl-33.065**. Das *para*-Chlor-substituierte Derivate **Schl-33.063** wies immerhin nach 72 h noch einen schwachen Effekte hinsichtlich der Paarungsstabilität und mit 40% Reduktion einen etwas stärkeren Effekt, bezüglich der Motilität auf (**Abb. 64**). Die Eiproduktion war hiervon ebenfalls nur leicht betroffen (**Abb. 65**). Bei den *meta*-substituierten Derivaten waren sowohl das Fluor- (**Schl-33.058**) als auch das Chlor-Derivat **Schl-33.064** bis 10  $\mu\text{M}$  aktiv. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den beiden Derivaten nicht. Beide wirken zeitverzögert nach 48 h auf die Eiproduktion, Paarungsstabilität und Motilität. Bezogen auf die Eiproduktion ist das Chlor-Derivat mit 26 Eiern gegenüber 56 Eiern nach 48 h und 0 Eiern gegenüber 18 Eiern nach 72 h etwas aktiver. Dieser Zusammenhang lässt sich nicht mit den elektronischen Eigenschaften erklären, da Fluor einen stärkeren Elektronenzug aufweist. Wäre der Elektronenzug an dieser Stelle entscheidend, müsste das Fluor-Derivat aktiver als das Chlor-Derivat sein. Ebenso wenig scheint dieser Umstand mit der besseren Stabilität des Fluor-Derivates gegenüber der biotransformativen

Dehalogenierung zusammenzupassen. Dabei sei angemerkt, dass auch Chlor-Derivate als eher biotransformationsstabil gelten, aber auch Defluorierungen prinzipiell möglich sind. Drastische Unterschiede hinsichtlich der Stabilität lassen sich hingegen erst für Brom- und Iod-Derivate erwarten. Etwaige Derivate wurden in diesem Kontext jedoch aufgrund der Tatsache, dass diese keinerlei Wirkstoffähnlichkeit besitzen, bewusst nicht dargestellt. Auch in der Größe unterscheiden sich beide Halogenatome. Da das Fluor mit einem *Van-der-Waals*-Radius von 147 pm gegenüber 175 pm beim Chlor kleiner ist, wäre zu erwarten, dass es den in einer potenziellen Bindungstasche zur Verfügung stehenden Platz, der bei einer gleichbleibenden Anordnung aller Phenylsulfonamide in der *meta*-Position begrenzt sein sollte, möglicherweise etwas besser ausfüllt. Ein letzter Unterschied von -F versus -Cl besteht in der Art von ausgebildeten Wechselwirkungen. Während der Fluorsubstituent einen schwachen Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor darstellt, bildet der Chlorsubstituent sogenannte Halogenbindungen aus. Dabei handelt es sich um nicht-kovalente Bindungen zwischen dem Chloratom als Lewis-Säure und einer Lewis-Base und damit einem Elektronenpaardonator. Die bei dieser Bindung zum Tragen kommende Elektronenpaarakzeptor-Eigenschaft des Chlorsubstituent basiert auf dem sogenannten  $\sigma$ -Loch, das durch eine ungleiche Ladungsverteilung (Anisotropie) an diesem Atom verursacht wird. Damit gibt es an diesem formal delta-positivierte ( $\delta^+$ ) Bereiche, die eine niedrigeren Elektronendichte besitzen. Zusammengefasst sei allerdings gesagt, dass sich Fluor und Chlor hinsichtlich ihrer Eigenschaften sehr ähneln und demzufolge auch deren biologische Aktivität vergleichbar ist. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass im Unterschied zu den bisherigen Beobachtungen die Besetzung der *para*-Position durch Halogenatome in diesem Fall nicht zu einer erwarteten Verbesserung der Aktivität führte. Beide Derivate waren jedoch aktiver als das unsubstituierte Phenylsulfonamid **Schl-32.330**. Bezüglich der Motilität besteht hier nach 72 h ein Unterschied von etwa 20% und bezüglich der Eizahl nach 48 h ein Unterschied von mehr als 70%. Wenngleich auch die *ortho*- und *para*-substituierten Derivate nach 72 h vereinzelt zu schwachen Darmdilatationen führen, sind die Darmdilatationen, welche durch das *meta*-Fluor- und *meta*-Chlor-Derivat verursacht werden, in ihrem Auftreten von größerer Regelmäßigkeit und Konstanz. Bei dem *meta*-Chlor-Derivat traten Darmdilatationen etwas früher auf als beim *meta*-Fluor-Derivat. Sie waren wie auch die ebenfalls auftretenden Tegumentschäden schwach bis mittelstark ausgeprägt.

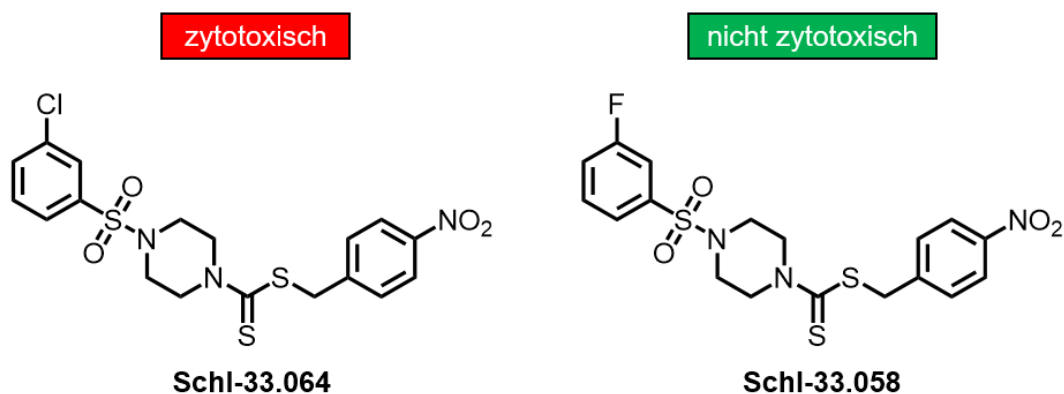


**Abbildung 64:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Fluor- bzw. Chlor-Substituent bei 10  $\mu$ M nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 65:** Vergleich der absoluten Eizahlen nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Fluor- bzw. Chlor-Substituent bei 10  $\mu$ M nach 24, 48 und 72 Stunden

Die mit einem Halogenatom-substituierten und antischistosomalen aktiven Derivate waren allesamt zytotoxisch, bis auf **Schl-33.058**, das sowohl gegenüber der HepG2- als auch der LS174T-Zelllinie bis 100  $\mu$ M unauffällig war (**Abb. 66**).

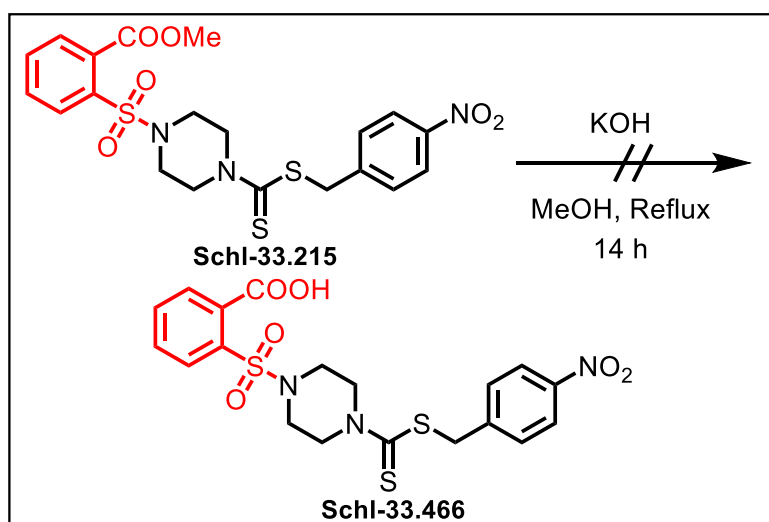


**Abbildung 66:** Zytotoxizität der Verbindung **Schl-33.064** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.058** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2- und der LS174T-Zelllinie

### Carbonsäure-, Carbonsäureester-, Carbonsäureamid-Substituenten

Im Anschluss daran wurden Derivate mit sowohl *-M*- als auch *-I*-Effekt dargestellt und getestet. Neben einer  $\text{COOH}$ -Gruppe ( $\text{clogP} = 1,79$ ) wurden eine  $\text{COOMe}$ - ( $\text{clogP} = 2,21$ ) und eine  $\text{CONMe}_2$ -Gruppe ( $\text{clogP} = 2,01$ ) eingeführt, die gleichwohl polar sind (**Tab. 12**).

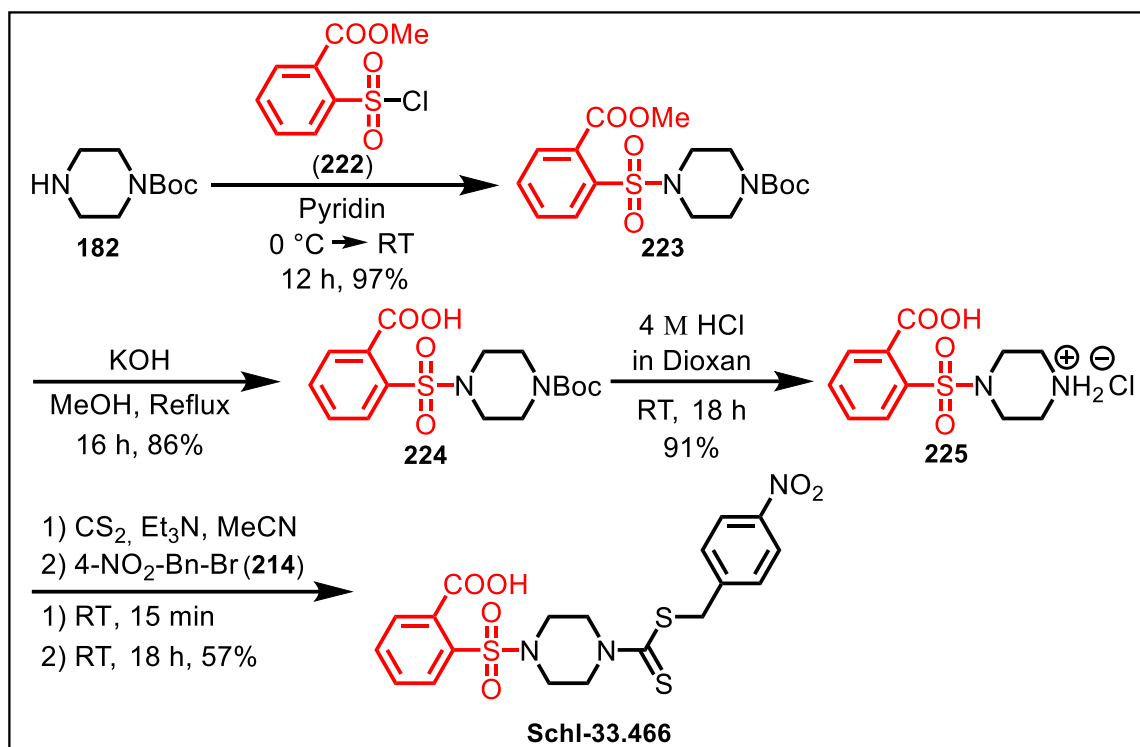
Die Derivate mit Carbonsäurefunktion wurden entweder über die bekannte Kondensationsreaktion nach CHAPMAN aus dem Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** und der entsprechenden (Chlorsulfonyl)benzoesäure dargestellt oder sie waren wie im Falle des 2-Benzoesäuresulfonylpiperazinamids **Schl-33.466** über den Benzoesäuremethylester durch Esterhydrolyse und damit einen Addition-Eliminierungs-Mechanismus zugänglich. Ein erster Versuch, das Phenyl-Derivat mit Carbonsäurefunktion in 2-Position aus dem Dithiocarbamat **Schl-33.215** darzustellen, schlug fehl (**Schema 33**).



**Schema 33:** Gescheiterte Darstellung des 2-Benzoesäuresulfonylpiperazin-Derivats aus dem entsprechenden Methylester durch Hydrolyse des Esters

Deshalb wurde im Weiteren *tert*-Butyl-4-((2-(methoxycarbonyl)phenyl)sulfonyl)-piperazin-1-carboxylat (**223**), welches zuvor aus Boc-Piperazin (**182**) erhalten wurde, mit KOH für 16 h unter Rückfluss erhitzt und zum Carboxylat verseift. Durch saure, wässrige Aufarbeitung wurde

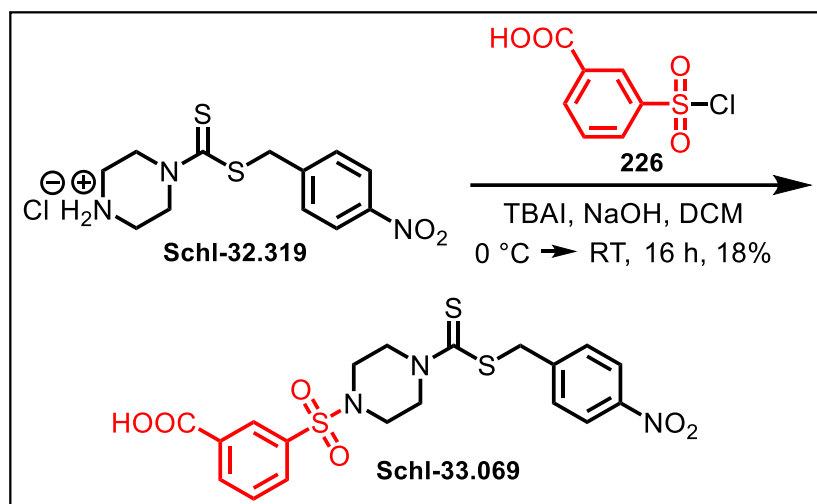
dies dann in die freie Säure **224** überführt. Nach Boc-Entschützung und *one-pot*-Reaktion mit CS<sub>2</sub> konnte schließlich das gewünschte Dithiocarbamat **Schl-33.466** in einer Gesamtausbeute von 43% isoliert werden (**Schema 34**).



**Schema 34:** Synthese des 2-Benzoesäuresulfonylpiperazin-Derivats **Schl-33.466** aus dem entsprechenden Methylester und Boc-Piperazin

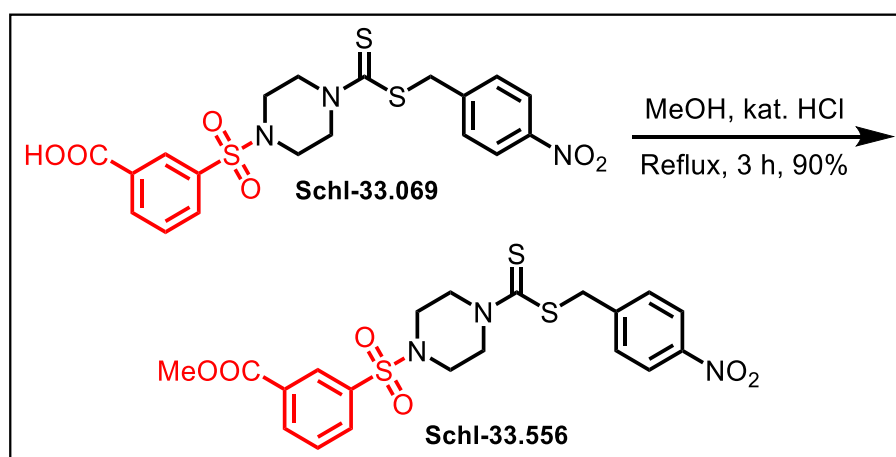
Die Darstellung des 3-Benzoesäuresulfonylpiperazinamids **Schl-33.069** gelang über eine Phasentransferkatalyse aus dem entsprechenden Sulfonsäurechlorid **226** und dem Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** (**Schema 35**). Erstgenanntes wurde dafür zu einer Suspension des Hydrochlorids und Natriumhydroxid in Dichlormethan getropft. Tetrabutylammoniumiodid ermöglichte nun den Durchtritt des unlöslichen Reaktanden durch die Phasengrenze, an welcher die Reaktion schließlich erfolgte. Nach saurer, wässriger Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt **Schl-33.069** in einer geringen Ausbeute von lediglich 18% erhalten werden. Grund für die niedrigen Ausbeuten bei der Synthese der Dithiocarbamate mit Benzoessäure-Funktion über die (Chlorsulfonyl)benzoessäuren ist vermutlich neben der Hydrolyse der Sulfonsäurechloride auch die Bildung von gemischten Anhydriden aus Carbon- und Sulfonsäure. Die freien Säurefunktionen machten zudem große Probleme bei der Aufarbeitung der Reaktionsprodukte, da sie unter anderem stark mit dem Kieselgel als Trägermaterial bei der Säulenchromatographie interagierten.





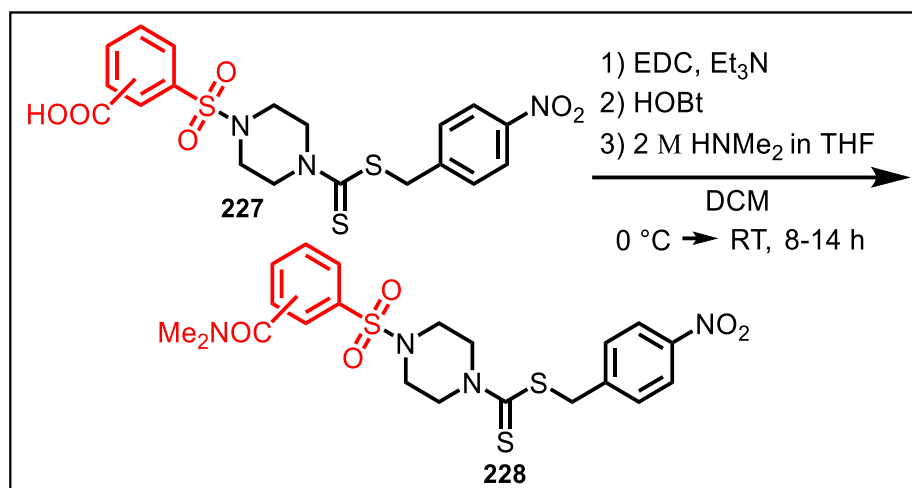
**Schema 35:** Synthese des 3-Benzoesäuresulfonylpiperazin-Derivats mittels Phasentransferkatalyse

Die Carbonsäuremethylester ergaben sich durch Reaktion von Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** mit dem entsprechenden 3-Chlorsulfonylmethylbenzoat oder sie wurden wie im Falle des *meta*-substituierten Derivats **Schl-33.556** durch Säure-katalysierte *Fischer*-Veresterung der Carbonsäure **Schl-33.069** mit Methanol über ein tetraedrisches Zwischenprodukt erhalten (**Schema 36**). Das Gleichgewicht der Reaktion wurde dabei nach LE CHATELIER durch den Überschuss von Methanol auf die Produktseite geschoben.



**Schema 36:** Synthese des Methylesters der 3-Benzoesäuresulfonylpiperazin-Verbindung mittels *Fischer*-Veresterung

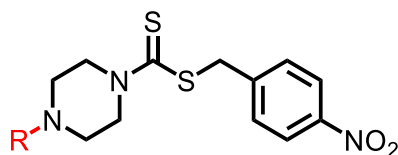
Die Carbonsäuredimethylamide **228** wurden aus den entsprechenden Carbonsäuren (**227**) und Dimethylamin mittels einer EDC-vermittelten Kupplungsreaktion in mäßigen Ausbeuten von 16-63% erhalten (**Schema 37**).



**Schema 37:** EDC-Kupplung zur Darstellung der (Dimethylcarbamoyl)phenylsulfonylpiperazin-Derivate aus den entsprechenden Carbonsäuren

Alle dargestellten Carbonsäure-Derivate sind in **Tabelle 11** aufgeführt. *In vitro* zeigten die Verbindungen mit Carbonsäure-, Carbonsäureamid- und Carbonsäureester-Gruppe mit Ausnahme des *meta*-substituierten Methylesters **Schl-33.556** keine antischistosomale Aktivität bei der initial getesteten Konzentration von 10 µM. Beim Methylester-Derivat variierten nach 72 h sämtliche Testparameter sehr stark. In der Summe schränkte diese Verbindung die Paarungsstabilität innerhalb von 72 h um etwa 60% ein und führte bezüglich der Motilität zu einem etwa 40%-igen Rückgang. Schwach bis mittlere Darmdilatationen waren nach meist 48 h sichtbar. Vereinzelt wurden diese von schwachen Tegumentschäden begleitet. Da die Verbindung mit Estergruppe aktiv war, ist der ausgebliebene Effekt der Verbindung mit Carbonsäure-Gruppe eventuell darauf zurückzuführen, dass diese nicht an den Wirkort gelangte. Die Carbonsäure-Gruppe liegt nämlich bei physiologischem pH-Wert als Carboxylat vor und kann daher Membranen nicht passieren. Der Ester ist dagegen zum Durchtritt durch Membranen befähigt und würde anschließend durch Esterasen gespalten. Er stellt also eine Art *Prodrug* dar. Ein grundlegender Unterschied zwischen den Substituenten besteht zudem darin, dass das durch innere Mesomerie stabilisierte Carboxylat einen geringeren -*M*-Effekt als der Ester und das Amid besitzt. Es hat von den drei genannten Gruppen die höchste Resonanzenergie und wird damit am stärksten mesomeriestabilisiert. Folglich verhält sich das Carboxylat gegenüber chemischen Reaktionen inert, wohingegen zumindest der Ester eine gewisse Reaktivität aufweist. In biologischen Systemen wären insbesondere Umesterungs-Reaktionen denkbar.

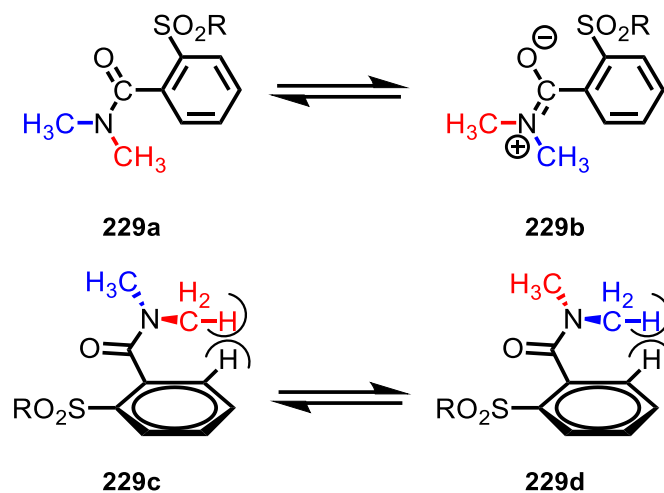
**Tabelle 11:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten der Phenylsulfonylpiperazin-Derivate mit COOH-, COOMe- und CONMe<sub>2</sub>-Gruppe (\*Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



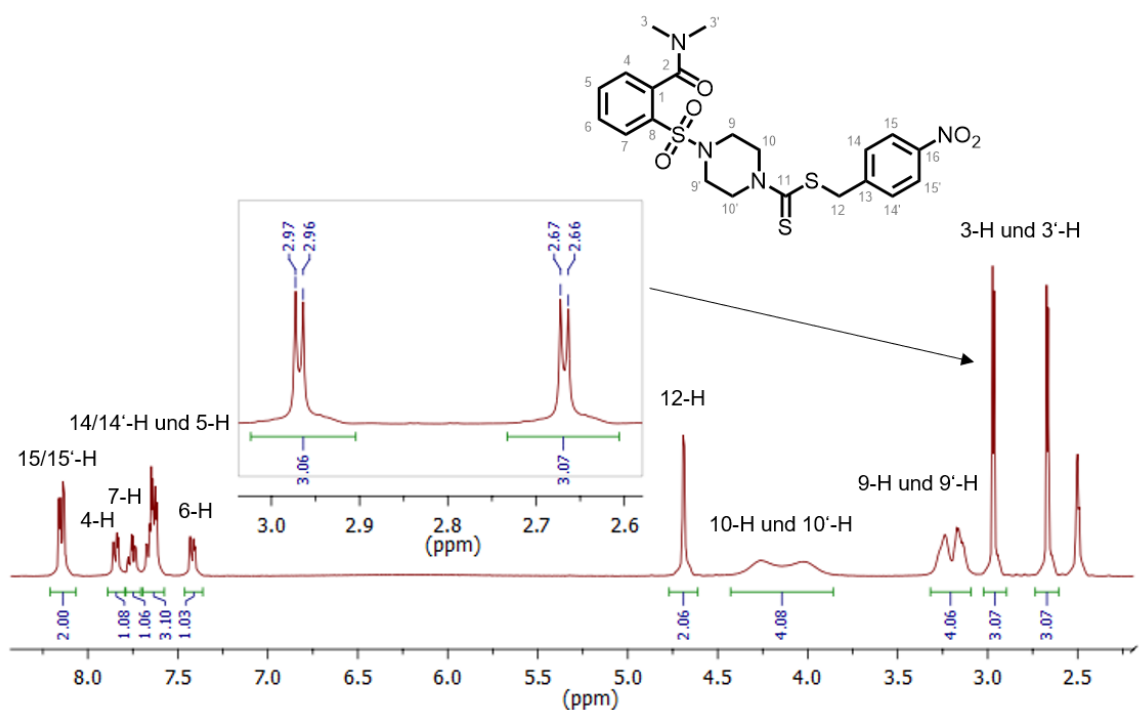
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.466</b>	43*	 <b>Schl-33.441</b>	68
 <b>Schl-33.069</b>	18	 <b>Schl-33.577</b>	16
 <b>Schl-33.068</b>	80	 <b>Schl-33.342</b>	33
 <b>Schl-33.215</b>	91	 <b>Schl-33.563</b>	63
 <b>Schl-33.556</b>	90		

Besonders auffällig war in diesem Fall das durch den partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung bedingte Auftreten zweier Methyl-Signale für die *N,N*-Dimethylamid-Teilstruktur in den Verbindungen **Schl-33.342/563**. Die Doppelbindung behindert die Rotation der *N,N*-Dimethylamino-Gruppe. Gemäß **229** steht eine der Methyl-Gruppen *cis*- ( $\delta = 2,93$ ), die andere *trans*-ständig ( $\delta = 3,00$ ) zum Carboxamid-Sauerstoff. Bei Raumtemperatur tauschen die *N*-Methyl-Protonen ihre Position im Molekül langsam aus und es kommt zur Ausbildung zweier Singulets im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum. Für die *ortho*-substituierte Verbindung **Schl-33.577** wurden nun jedoch anstelle der Singulets zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstanten von  $J = 3,2$  Hz bzw.  $J = 3,5$  Hz für die Methyl-Protonen detektiert (**Abb. 68**). Jene Multiplizität

lässt sich durch die Kopplung der Methyl-Protonen durch den Raum mit einem der Protonen des aromatischen Rings gemäß **Abbildung 67** erklären.



**Abbildung 67:** Rotationsisomere im *N,N*-Dimethylamid-Teilsystem bedingt durch den Austausch der *N*-Methyl-Protonen und Kopplung der Methylprotonen mit dem aromatischen Ringsystem durch den Raum

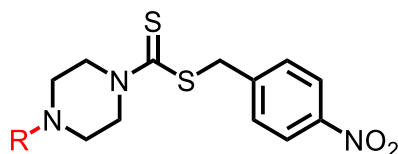


**Abbildung 68:** Bearbeitetes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Schl-33.577 mit zwei Dubletts für die die Methyl-Gruppen (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

### Cyano- und Nitro-Substituenten

Zuletzt wurden die noch stärker elektronenziehenden und polarerer Cyano- ( $\text{clogP} = 2,14$ ) und Nitro-Derivate ( $\text{clogP} = 1,38$ ) mit Substituenten in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position dargestellt und getestet (**Tab. 12**).

**Tabelle 12:** Strukturformeln und Ausbeuten der Phenylsulfonylpiperazin-Derivate mit NC-, NO<sub>2</sub>-Gruppe

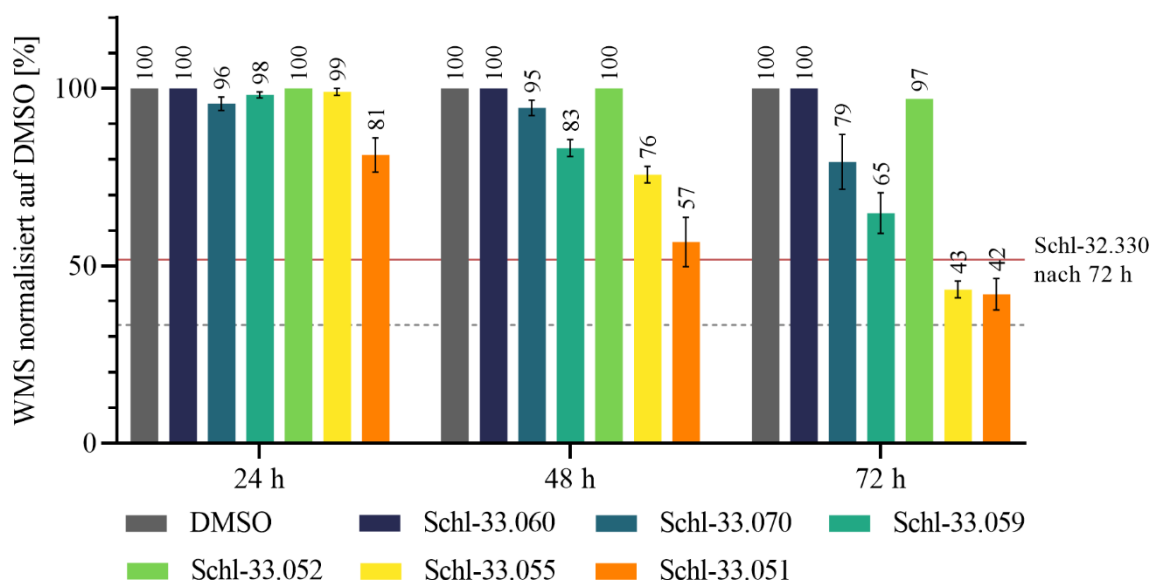


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.060	55	 Schl-33.070	65	 Schl-33.059	53
 Schl-33.052	84	 Schl-33.055	97	 Schl-33.051	45

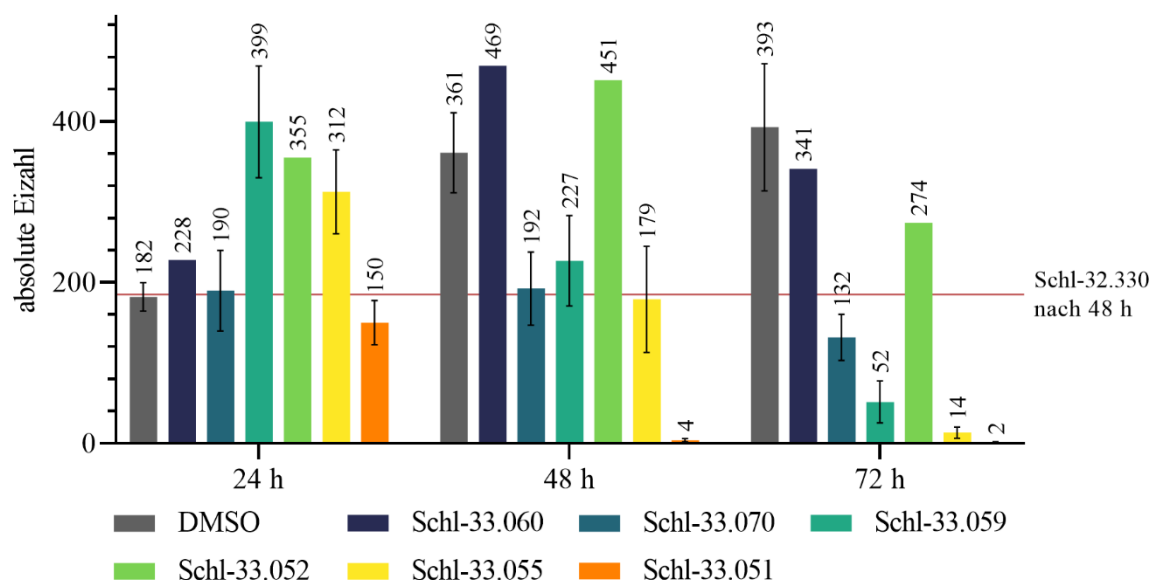
Das *meta*-Cyano-Derivat **Schl-33.070** zeigte bezüglich Motilität und Paarungsstabilität nur schwache Effekte, wohingegen das *para*-Cyano-Derivat **Schl-33.059** innerhalb von 72 h immerhin zu etwa 60% Entpaarung führte und die Motilität um etwa 35% reduzierte (**Abb. 69**). Vor allem hatte es aber einen Einfluss auf die Eiproduktion. So wurden gegenüber der DMSO-Kontrolle etwa 90% weniger Eier gezählt (**Abb. 70**). Die Phänotypen des *meta*-Cyano-Derivats beschränkten sich auf vereinzelt schwache Tegumentschäden, die des *para*-substituierten-Derivats auf starke Darmdilatationen sowie schwach bis mittlere Tegumentschäden. Diese traten nach etwa 48 h auf.

Es zeigte sich, dass die Cyano-Derivate insgesamt weniger aktiv waren als die Nitro-Derivate, von denen aber das *ortho*-Nitro-Derivat keine Wirkung zeigte. Das *para*-Nitro-Derivat **Schl-33.051** war im Vergleich zum *meta*-Nitro-Derivat **Schl-33.055** wiederum etwas aktiver, was vor allem die Eiproduktion und das Paarungsverhalten betrifft. Zudem wirkte es etwas früher, wenn man die 48 h-Werte untereinander vergleicht. Zu jenem Zeitpunkt ist das *para*-Nitro-Derivat, zumindest bezogen auf die Reduktion der Eiproduktion, bereits deutlich wirksamer als das unsubstituierte Phenylsulfonamid **Schl-32.330**. Sowohl das *meta*- als auch

das *para*-Nitro-Derivat führten über 72 h zu einer etwa 60%-igen und damit etwa 10% stärkeren Reduktion der Motilität als **Schl-32.330**. Während beim *para*-substituierten-Derivat schwach bis mittlere Tegumentschäden beobachtet wurden, waren beim *meta*-substituierten-Derivat insbesondere starke Darmdilataationen erkennbar. Vergleicht man die Testergebnisse der Nitro-Derivate mit denen der antischistosomal unauffälligen Anilin-Derivate, so lässt sich sagen, dass eine bioreduktive Transformation der Nitrogruppe zur Inaktivierung dieser führt.

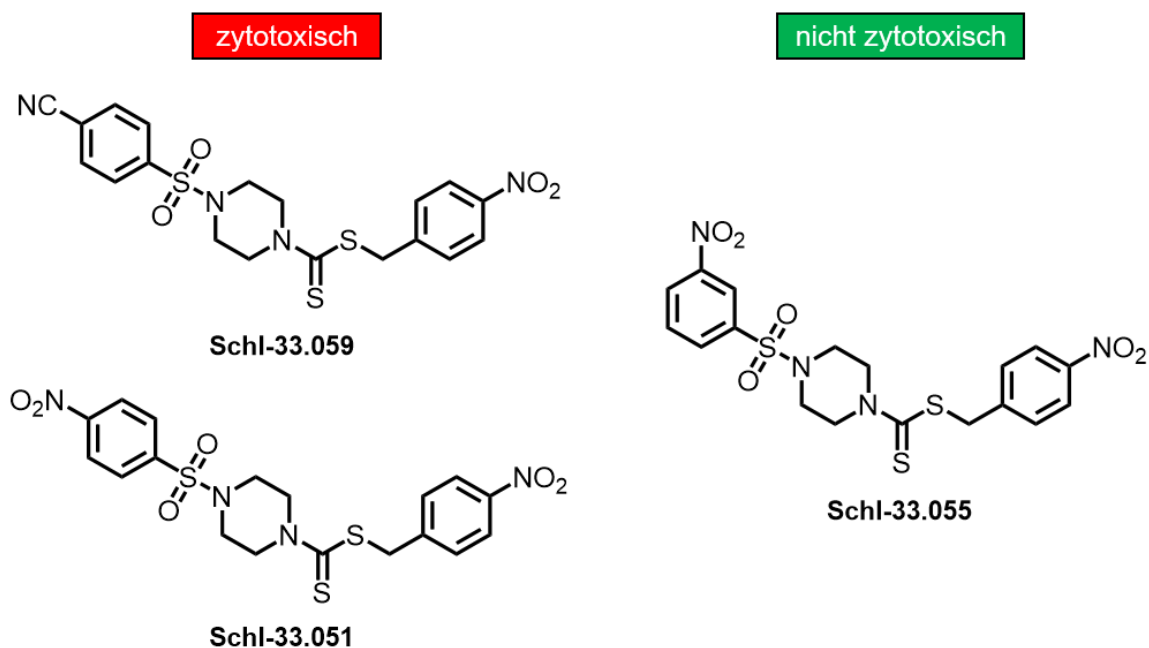


**Abbildung 69:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Cyano- bzw. Nitro-Substituent bei 10  $\mu$ M nach 24, 48 und 72 Stunden



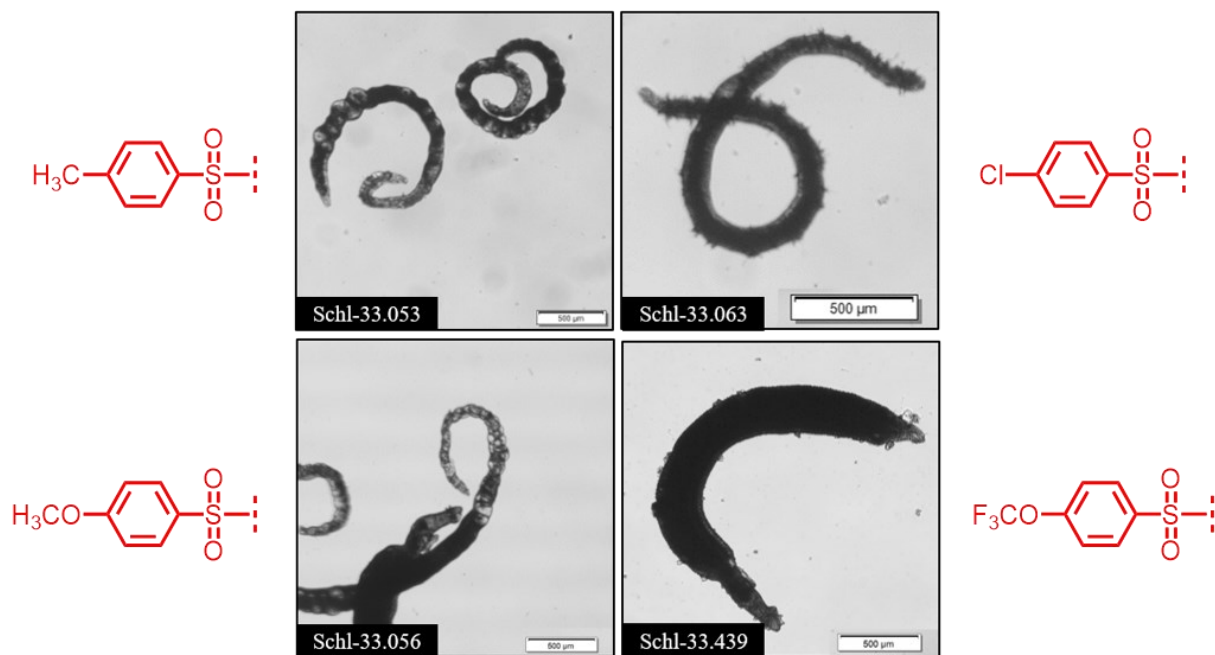
**Abbildung 70:** Vergleich der absoluten Eizahlen von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Phenylsulfonamid-Derivaten mit Cyano- bzw. Nitro-Substituent bei 10  $\mu$ M nach 24, 48 und 72 Stunden

Unauffällig hinsichtlich der Zytotoxizität bei 100  $\mu\text{M}$  war von den antischistosomal aktiven Cyano- und Nitro-Derivaten lediglich **Schl-33.055**, dies jedoch sowohl gegenüber HepG2- als auch LS174T-Zellen (**Abb. 71**).



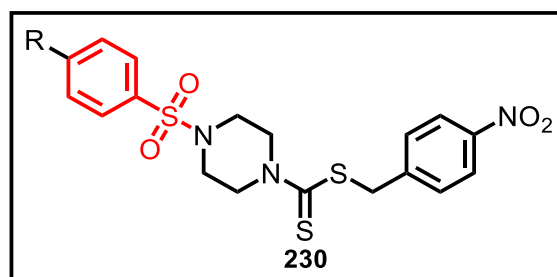
**Abbildung 71:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.059/051** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.055** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2- und der LS174T-Zelllinie

Nachfolgend werden ausgewählte Bilder der durch die mono-substituierten Phenylsulfonamid-Derivate verursachten Phänotypen gezeigt (**Abb. 72**).



**Abbildung 72:** Exemplarische Phänotypen der mono-substituierten Phenylsulfonamid-Derivate nach 72 h bei 10  $\mu\text{M}$ ; **Schl-33.053/056**: brezel-/ hakenförmig angeordnete Weibchen mit Darmdilataationen; **Schl-33.063**: nadelförmige Tegumentveränderung eines Weibchens mit Strukturverlust; **Schl-33.439**: Männchen mit Warzen und Tegumentbläschen

Versucht man, alle aktiven Substituenten in *para*-Position hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu ordnen und berücksichtigt dabei die Einflussnahme auf alle biologischen Parameter, so ergibt sich die in **Abbildung 73** aufgeführte Reihenfolge:



R: OMe > OCF<sub>3</sub> > Me = CF<sub>3</sub> > NO<sub>2</sub> > CN > Cl

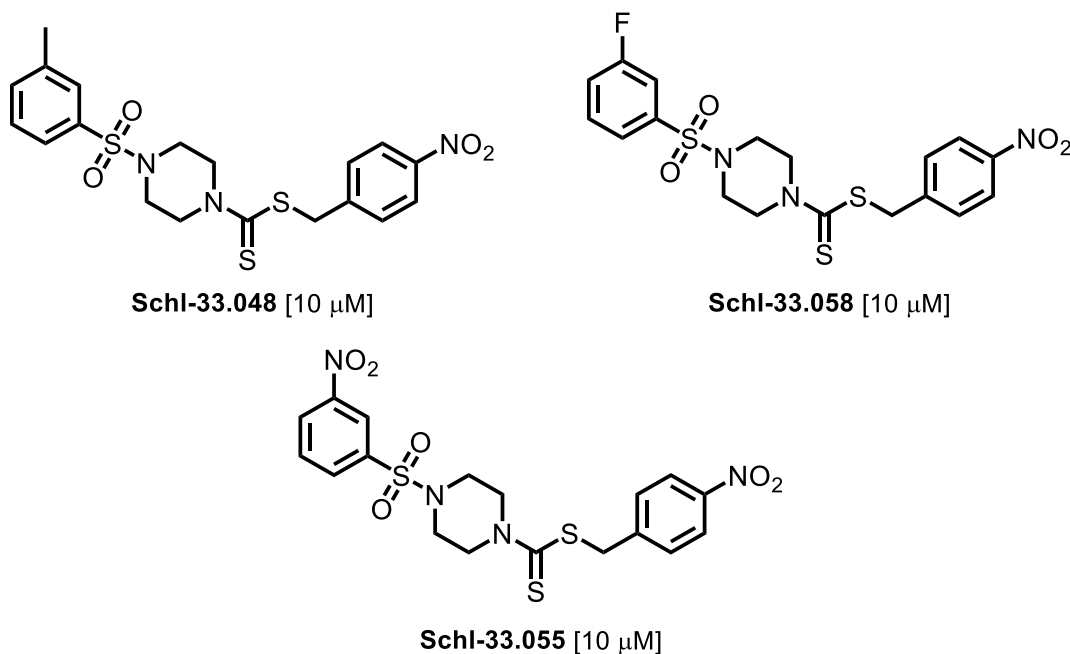
**Abbildung 73:** Reihung der Aktivität der *para*-substituierten Phenylsulfonamid-Derivate

Demnach scheinen Derivate mit überwiegend +*M*-Effekt (-OMe und -OCF<sub>3</sub>) am aktivsten zu sein, wenn sie ein bestimmtes Mindestvolumen einnehmen. Die CF<sub>3</sub>-Gruppe mit einem *Van-der-Waals*-Radius von 2,7 Å weist dabei ein Volumen von 82,4 Å<sup>3</sup> auf und die CH<sub>3</sub>-Gruppe mit einem *Van-der-Waals*-Radius von 2,0 Å ein Volumen von 33,5 Å<sup>3</sup>. Weiterhin zeigen Substituenten mit ähnlicher Größe auch ähnliche Aktivität (-CH<sub>3</sub> und CF<sub>3</sub>, beide aber kleiner als -OMe und -OCF<sub>3</sub>; daher auch weniger aktiv). Die Tatsache, dass sowohl +*I*- als auch -*I*-Substituenten zu ähnlicher Aktivität führen, deutet auf die untergeordnete Rolle von elektronischen Effekten hin. Weniger aktiv sind solche Derivate mit einem -*M*- und -*I*-Substituenten (-NO<sub>2</sub> und -CN) und damit stark elektronenziehenden Gruppen. Die am wenigsten wirksamen Verbindungen sind die mit einem überwiegend -*I*-Substituenten und kleinem Raumbedarf (deshalb ist -F gegenüber -Cl inaktiv). Auch kleine Substituenten mit starker Neigung zur Wirkung insbesondere als H-Brückenbindungsdonator (-NH<sub>2</sub> und -OH) sind inaktiv.

Von allen Derivaten der Phenylsulfonamide mit einem Substituenten in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position, die bis 10 µM antischistosomale Aktivität und bis 100 µM nicht zytotoxisch sowohl gegenüber der HepG2- als auch der LS174T-Zelllinie waren, sind **Schl-33.048**, **Schl-33.058** und **Schl-33.055** zu nennen (**Abb. 74**). Dabei ist auffällig, dass ausschließlich die *meta*-Substitution zu nicht zytotoxischen Verbindungen führte, wenngleich die Substitution in *para*-Position im Allgemeinen antischistosomale aktivere Derivate hervorbrachte. Ein allzu großer Unterschied hinsichtlich der antischistosomalen Wirkung unter den *meta*-substituierten Derivaten wie bei den *para*-substituierten Derivaten gemäß **Abbildung 73** ist nicht festzustellen. Jedoch ist von einer Profilierung von **Schl-33.055** infolge des Vorhandenseins gleich zweier Nitro-Gruppen und der damit einhergehenden Problematik wie etwa der



Phototoxizität oder dem verstärkten Auftreten toxischer Abbauprodukte, eher abzuraten. Insgesamt führte die Derivatisierung am Phenylsulfonyl-Rest damit zwar zu keiner antischistosomalen Wirkungssteigerung in Form eines Konzentrationssprungs auf 5  $\mu\text{M}$ . Dennoch brachte die mono-Substitution Verbindungen hervor, die gegenüber dem unsubstituierten Phenylsulfonamid, das oberhalb von 50  $\mu\text{M}$  zellschädigend wirkte, weniger zytotoxisch waren.

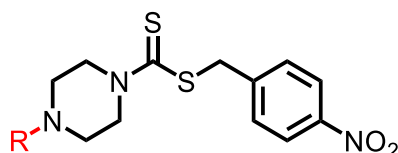


**Abbildung 74:** Strukturformeln der wirksamsten und bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxischen Derivate der Phenylsulfonamide mit einem Substituenten in 2-, 3- oder 4-Position und deren jeweils niedrig wirksamste Konzentration

### 3.3.2 Phenylsulfonamid-Derivate mit mehreren Substituenten

Die Derivatisierung des Phenylsulfonylpiperazins wurde durch Multisubstitutionen des Aromaten ergänzt. Es entstanden ein 2-Mesitylensulfonyl- (**Schl-33.542**) und ein Pentafluorbenzolsulfonyl-Derivat (**Schl-33.532**) (**Tab. 13**). Während der Aromat des Mesitylen-Derivats durch die *+I*-Effekte der Methylgruppen elektronenreicher als der unsubstituierte Phenylrest ist, ist der fünffach Fluor-substituierte Benzolring elektronenarm. Zusätzlich wurden Derivate dargestellt, die zwei zuvor in der *in-vitro*-Testung als günstig erachtete Substituenten vereinten.

**Tabelle 13:** Strukturformeln und Ausbeuten der mehrfach substituierten Phenylsulfonylpiperazin-Derivate

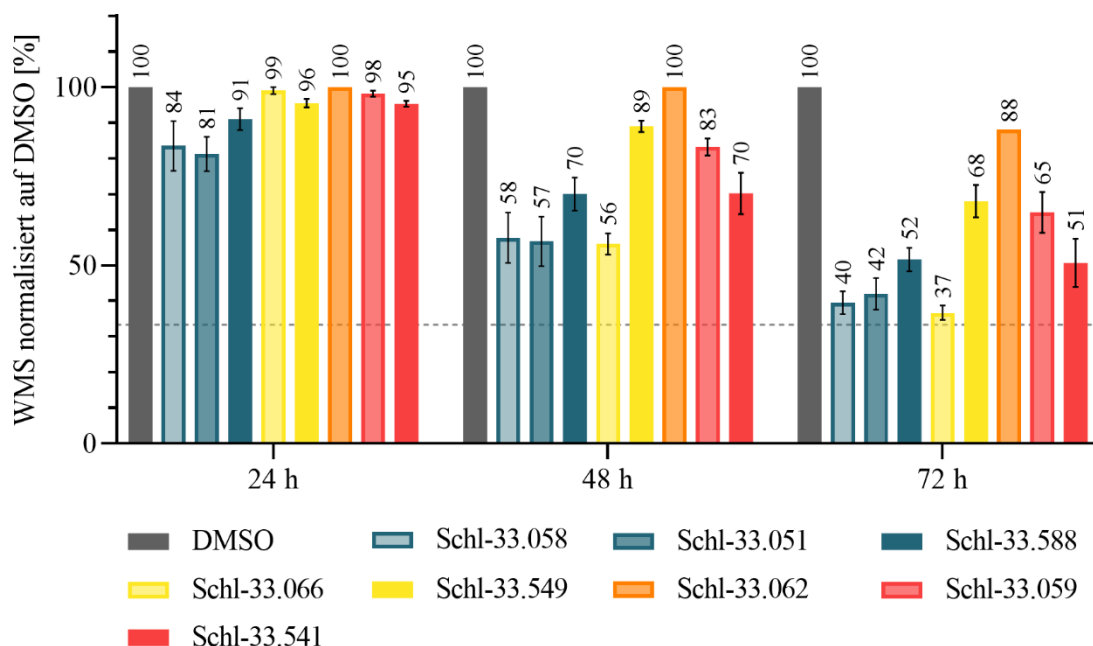


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.542</b>	22	 <b>Schl-33.543</b>	97
 <b>Schl-33.532</b>	42	 <b>Schl-33.549</b>	72
 <b>Schl-33.548</b>	77	 <b>Schl-33.541</b>	62
 <b>Schl-33.588</b>	50		

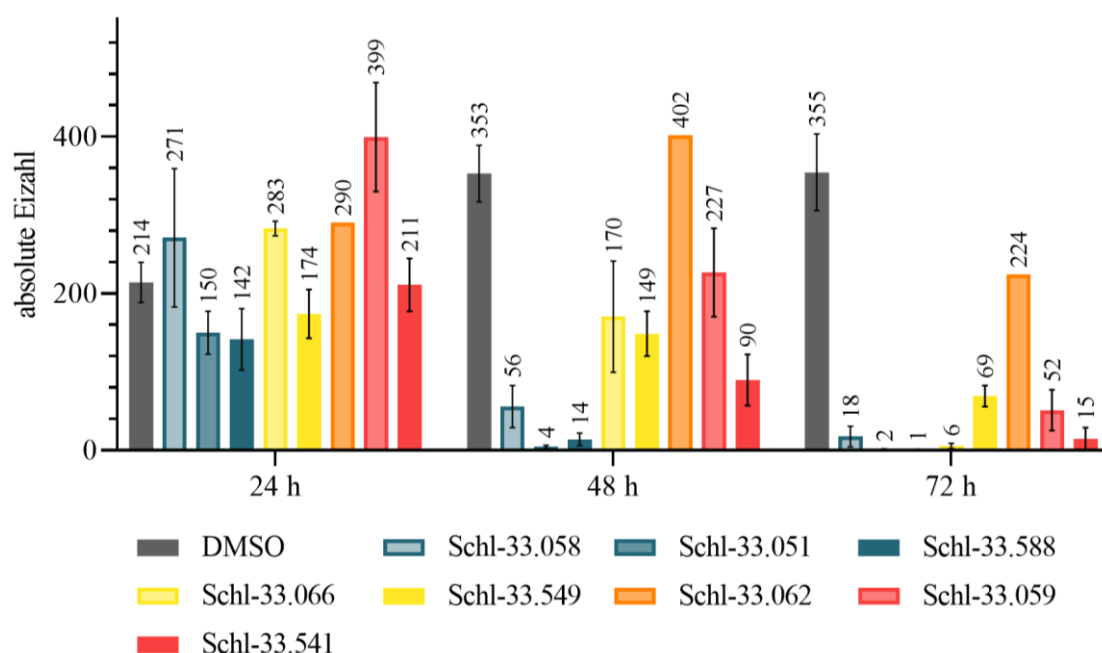
Dies waren ein Phenylderivat (**Schl-33.548**) mit Methyl-Gruppe in *para*-Position und einer Nitro-Gruppe in *meta*-Position sowie ein Derivat (**Schl-33.588**) mit einer Nitro-Gruppe in *para*-Position und einem Fluor-Substituenten in *meta*-Position. Ebenso wurden drei Phenylderivate mit einem Chlorsubstituenten in *ortho*-Position dargestellt, der sich als weniger günstig hinsichtlich der Platzierung eines etwaigen Substituenten herausgestellt hatte. Eines der



Derivat **Schl-33.051** (Abb. 76+77). **Schl-33.588** zeigte keine Phänotypen, wohingegen das Nitro-Derivat Tegumentschäden herbeiführte. Das Fluor-Derivat hatte zusätzlich noch die Bildung von Darmdilatationen zur Folge. Der Unterschied bei der Reduktion der Motilität lag nach 72 h verglichen mit dem Fluor- und dem Nitro-Derivat bei etwa 10%.



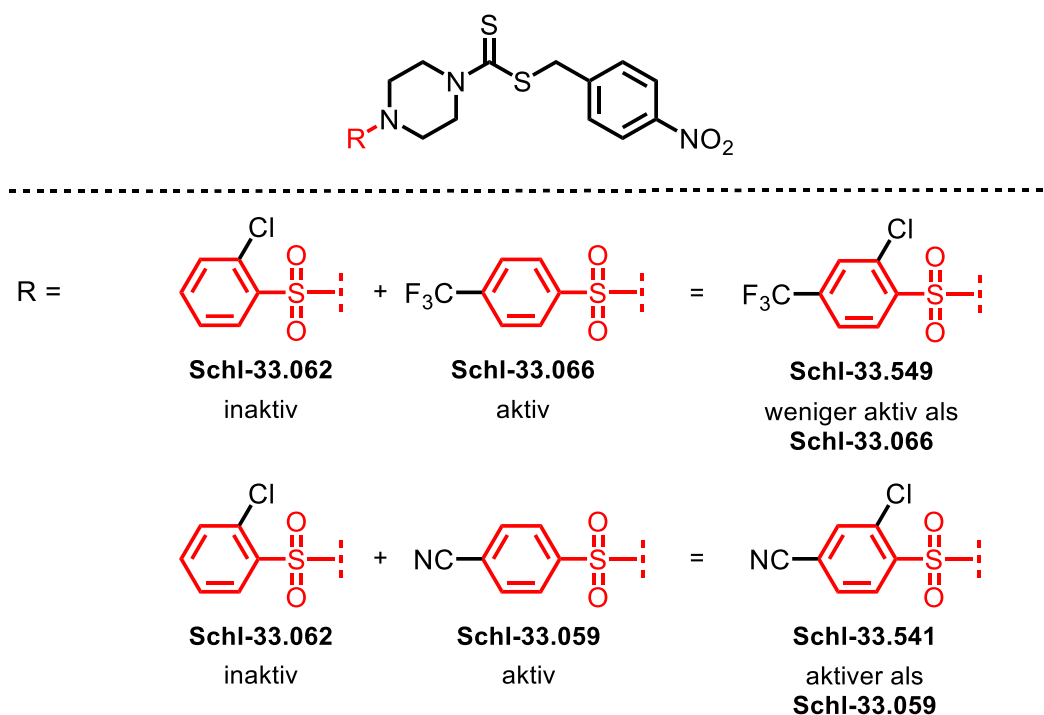
**Abbildung 76:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den multisubstituierten Phenylsulfonamid-Derivaten und den entsprechenden monosubstituierten Phenylsulfonamid-Derivaten bei 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 77:** Vergleich der absoluten Eizahlen nach Behandlung mit den multisubstituierten Phenylsulfonamid-Derivaten und den entsprechenden monosubstituierten Phenylsulfonamid-Derivaten bei 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden

Für die Derivate **Schl-33.549** und **Schl-33.541** wurde nach Addition der Einzeleffekte von **Schl-33.062** und dem mono-substituierten Trifluormethyl- (**Schl-33.066**) bzw. Cyano-

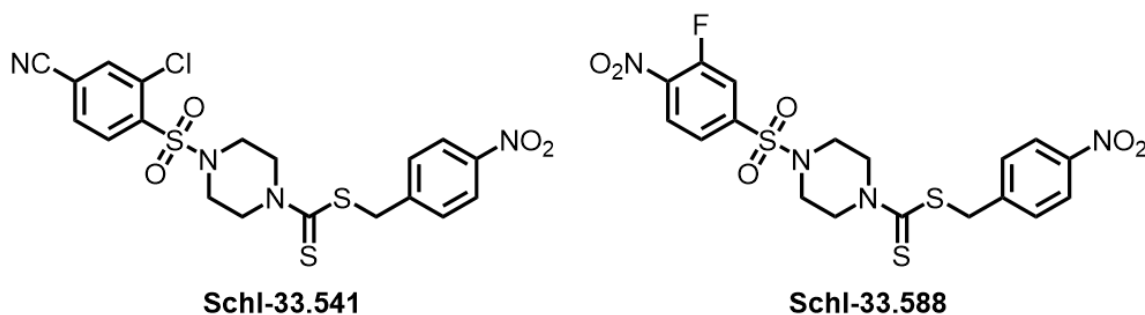
Derivat **Schl-33.059** eine verminderte Aktivität erwartet, da das mono-Chlor-Derivat einen Chlorsubstituenten in der ungünstigen *ortho*-Position besaß, das selbst keinerlei Wirkung entfaltet hatte. Dies traf tatsächlich auch auf das 2-Chlor-4-trifluormethyl-benzolsulfonyl-Derivat **Schl-33.549** zu, das nur zu einer schwachen Reduktion der Paarungsstabilität sowie einer schwach verminderten Produktion der Eier und vereinzelt schwachen Darmdilataationen führte. Beim mono-substituierten Trifluormethyl-Derivat **Schl-33.066** waren nicht nur jene Effekte deutlicher ausgeprägt, sondern auch die Motilität wurde hier um etwa 30% stärker reduziert. Beim 2-Chlor-4-cyan-benzolsulfonyl-Derivat **Schl-33.541** sah das etwas anders aus. Es war annähernd in allen Belangen dem mono-substituierten Cyano-Derivat **Schl-33.059** überlegen (**Abb. 78**). Im Schnitt führte es zu etwa 30% mehr Entpaarungen, etwa 70% weniger Eiern und zu einer etwa 15% stärkeren Reduktion der Motilität (**Abb. 76+77**). Jedoch verursachte es etwas schwächere Tegumentschäden und Darmdilataationen.



**Abbildung 78:** Kombination verschieden aktiver monosubstituierter Phenylsulfonamid-Derivaten zu einem disubstituierten Phenylsulfonamid

Insgesamt ist festzustellen, dass die Unterschiede der mono- gegenüber den multisubstituierten Derivaten gering waren. Eine Addition der Einzeleffekte ist nicht zwangsläufig gegeben. Werden zwei zuvor aktive Substituenten in einem Derivat zusammengefasst, so ist das resultierende disubstituierte Derivat nicht automatisch aktiver. Darüber hinaus ist jene Betrachtung insofern unvollständig, da sterische Effekte hierbei vernachlässigt werden. Die multisubstituierten Derivate **Schl-33.541** und **Schl-33.588**, die bis 10 µM antischistosomal wirksam waren, waren bei 50 µM nicht zytotoxisch, wobei Letzteres nur gegenüber der LS174T-Zelllinie unauffällig blieb.

nicht zytotoxisch

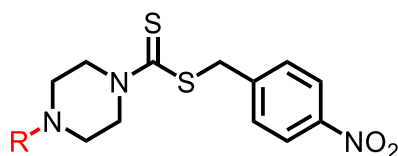


**Abbildung 79:** Zytotoxizität der Verbindung **Schl-33.541** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie und von **Schl-33.588** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie (zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie)

### 3.3.3 Weitere aromatische Sulfonamid-Derivate

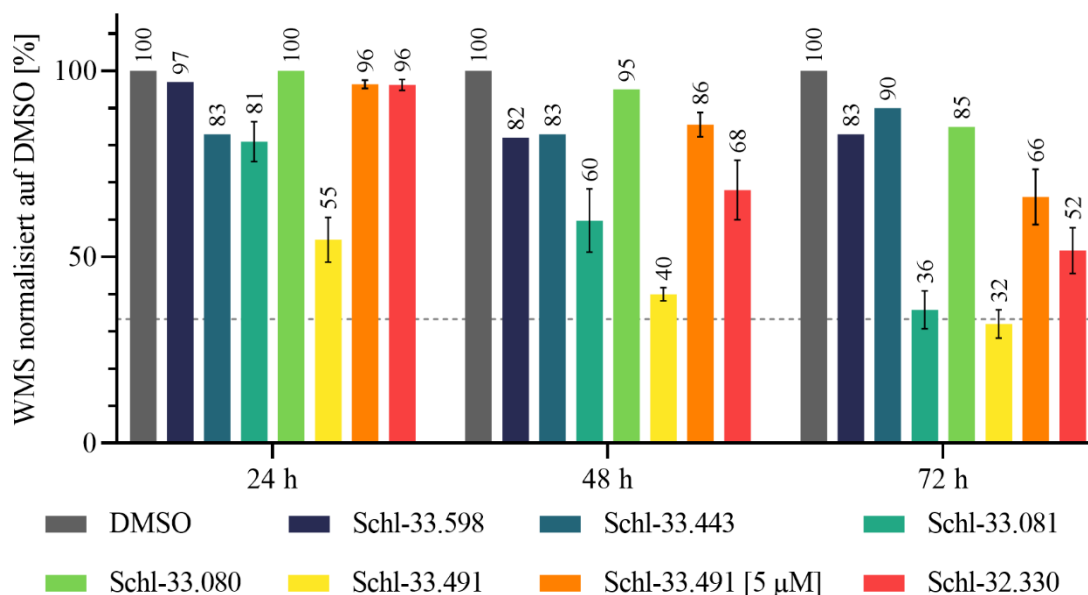
Da sich die 4-Position bei den Phenylsulfonamiden als jene Position herauskristallisiert hatte, in der das Einbringen eines Substituenten am ehesten toleriert wurde, wurde diese für weitere Derivatisierung genutzt. Nimmt man eine stets gleiche Positionierung der Sulfonamid-Derivate in einem möglichen Zielenzym an, scheint die *para*-Position am geeignetsten und lässt hier den größten Spielraum. Dieser sollte durch verschieden lange und sterisch unterschiedlich anspruchsvolle Alkylketten bestmöglich ausgeleuchtet werden. Neben einem *n*-Butyl- (**Schl-33.598**) und Isopropyl-Rest (**Schl-33.443**) wurde auch ein *tert*-Butyl-Rest (**Schl-33.081**) eingeführt (**Tab. 14**).

Mit zunehmender Verzweigung erhöht sich dabei der sterische Anspruch. Die elektronischen Eigenschaften, die durch die positiven induktiven Effekte der Alkylreste verursacht werden, führen allesamt im Vergleich zum unsubstituierten Phenylrest zu einer Erhöhung der Elektronendichte des aromatischen Systems, wobei diese beim *tert*-Butyl größer als beim *n*-Butyl ist. Das hängt damit zusammen, dass sich der induktive Effekt über mehrere Bindungen hinweg auf andere Atome auswirken kann, jedoch mit der Entfernung abnimmt. Auch ein Derivat mit Biphenyl-Rest (**Schl-33.080**), das über die 4-Position verknüpft ist, wurde dargestellt. Die Biphenylstruktur ist von den genannten Resten die sterisch anspruchsvollste Gruppe. Im planaren Zustand ist die Resonanzenergie dabei am größten, aber andererseits auch die *van-der-Waals*-Abstoßung maximal. Bei einer Verdrillung um 90° ist nunmehr die *van-der-Waals*-Abstoßung minimal, die Resonanzenergie dafür aber nicht mehr vorhanden. Im realen System wird sich hier wohl eine Geometrie mittlerer Torsion einstellen.

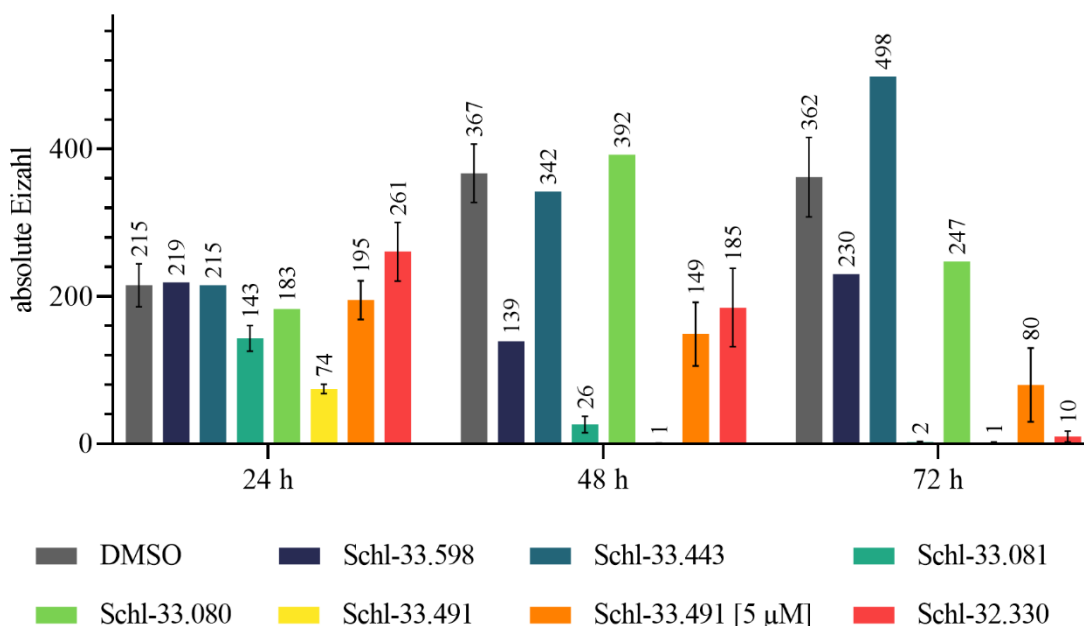
**Tabelle 14:** Strukturformeln und Ausbeuten weiterer aromatischer Sulfonamid-Derivate


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.598</b>	45	 <b>Schl-33.599</b>	58
 <b>Schl-33.443</b>	71	 <b>Schl-33.353</b>	37
 <b>Schl-33.081</b>	41	 <b>Schl-33.572</b>	58
 <b>Schl-33.080</b>	82	 <b>Schl-33.618</b>	58
 <b>Schl-33.491</b>	30		

Alle zuletzt beschriebenen Verbindungen waren bei 10  $\mu\text{M}$  mit Ausnahme des *tert*-Butyl-Derivates **Schl-33.081** jedoch wirkungslos. Letzteres verursachte nach 48 h neben mittleren Darmdilataionen auch schwache Tegumentschäden und führte über 72 h zur vollständigen Entpaarung sowie der kompletten Einstellung der Produktion an Eiern (**Abb. 81**). Die Motilität, die nach 48 h um 40% vermindert war, sank nach insgesamt 72 h um mehr als 65% (**Abb. 80**). Vereinzelt wirkte die Verbindung letal auf die Schistosomen. Bei 5  $\mu\text{M}$  waren nur noch vereinzelt schwache Darmdilataionen, eine schwach verminderte Paarungsstabilität und um 30% reduzierte Motilität sichtbar.



**Abbildung 80:** Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit in 4-Position substituierten Phenylsulfonamid-Derivaten sowie des Benzylsulfonamid-Derivats bei 5 µM und 10 µM (24, 48, 72 h)



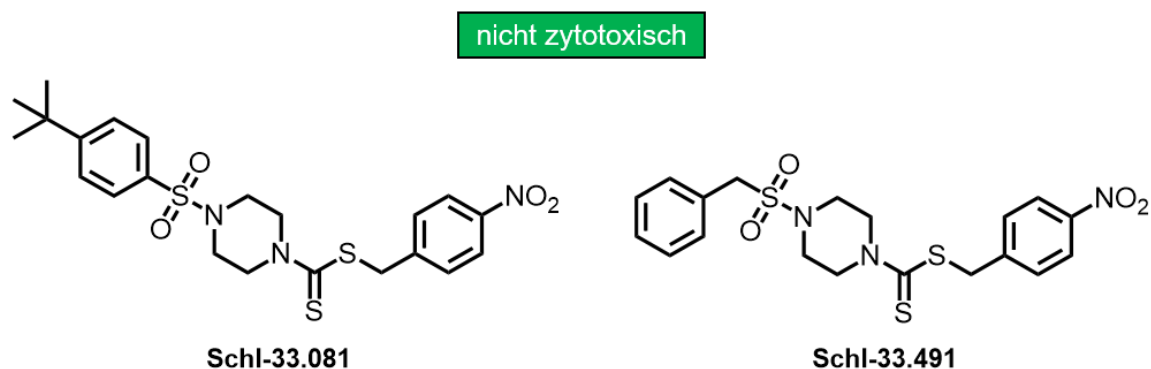
**Abbildung 81:** Absolute Eizahlen von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit in 4-Position substituierten Phenylsulfonamid-Derivaten sowie des Benzylsulfonamid-Derivats bei 5 µM und 10 µM (24, 48, 72 h)

Das unsubstituierte Phenylsulfonamid **Schl-32.330** zeigte bereits gute physiologische Wirksamkeit. Durch Einbau eines Linkers von der Länge einer Methylen-Einheit zwischen der Sulfonyl-Gruppe und dem Phenyl-Ring wurde eine Aktivitätssteigerung erwartet (**Tab. 14**). Das Benzyl-Derivat **Schl-33.491**, das möglicherweise tiefer in eine etwaige Bindungstasche hineinreicht, erwies sich tatsächlich als aktiver. Ein Unterschied bei 10 µM bestand jedoch hinsichtlich eines um 24 h verspäteten Wirkeintritts des Phenyl-Derivats und eines um etwa 20% weniger starken Rückgangs der Motilität (**Abb. 80**). Während die Motilität bei dem Phenyl-Derivat über 72 h um etwa 50% reduziert wurde, lag die Reduktion beim Benzyl-



Derivat bei etwa 70%; es war damit also auch letal. Phänotypen, die durch das Benzyl-Derivat zu Tage traten, hatten die Gestalt von schweren bis sehr schweren Tegumentschäden und konnten schon nach 24 h wahrgenommen werden. Beim Phenyl-Derivat waren hingegen lediglich mittlere bis starke Dilatationen des Darmtraktes erkennbar, die aber erst nach 48 h auftraten. Ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  war das Benzyl-Derivat deutlich weniger aktiv und führte wie auch das Phenyl-Derivat nur noch zur Entpaarung von etwa der Hälfte aller Würmer. Darüber hinaus hatte es im Gegensatz zu dem Phenyl-Derivat mit 80 Eiern innerhalb des letzten Zeitintervalls der Testung nur noch eine schwache Wirkung auf die Eiproduktion und die Motilität (**Abb. 81**). Letztere wurde weiterhin um etwa 35% reduziert. Darmdilatationen und Tegumentschäden, die das Phenyl-Derivat bei 5  $\mu\text{M}$  nicht mehr verursachte, waren hier von schwacher Natur (**Abb. 83**). Unterhalb von 5  $\mu\text{M}$  war dann auch das Benzyl-Derivat gänzlich inaktiv.

Das *tert*-Butyl-Derivat **Schl-33.081** das bis 5  $\mu\text{M}$  schwach wirkte, war gegenüber der HepG2-Zelllinie bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  unauffällig, wohingegen das Benzyl-Derivat **Schl-33.491**, das ebenfalls bei 5  $\mu\text{M}$  noch aktiv war, nur bis 50  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch auf LS174T-Zellen wirkte (**Abb. 82**).



**Abbildung 82:** Zytotoxizität der Verbindung **Schl-33.081** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.491** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie (zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber HepG2-Zelllinie)

Ein 2-Naphthylsulfonylpiperazin-Derivat (**Schl-33.599**) und damit ein über die *meta*- und *para*-Position verknüpftes Phenylderivat entstand als Ergänzung zu einem von P. MÄDER synthetisierten und getesteten 1-Naphthylsulfonylpiperazin-Derivat (**Tab. 14**). Führte Letzteres aufgrund des vermeintlich ungünstigen sterischen Anspruchs bei 10  $\mu\text{M}$  noch zu keinerlei antischistosomaler Aktivität, so war sein Konstitutionsisomer insofern aktiv, als es nach 72 h zur vollständigen Entpaarung aller Würmer und Reduktion der Eiproduktion führte (**Abb. 85**). Innerhalb der letzten 24 h der Testung wurden so lediglich noch etwa 20 Eier gelegt. Nach 72 h kam es zu Darmdilatationen mittleren Ausmaßes vorwiegend bei den Weibchen, aber auch Männchen wurden mit Darmdilatationen gesichtet. Die Motilität war schließlich um bis zu 50%

zurückgegangen (**Abb. 84**). Das 2-Naphthylsulfonyl-Derivat **Schl-33.599** ist dem 2,3-Dihydrobenzo-1,4-dioxin-6-sulfonyl-Derivat **Schl-33.353** strukturell ähnlich, das anstelle eines annelierten Benzolrings einen Dioxan-Ring und damit ein kleineres aromatisches System besitzt. Durch die beiden Ring-Sauerstoffatome besitzt es gegenüber dem 2-Naphthyl-Derivat ( $\text{clogP} = 3,50$ ) einen etwas niedrigeren  $\text{clogP}$ -Wert von 2,28 und damit vermutlich bessere Wasserlöslichkeit. **Schl-33.353** hatte über 72 h hinweg einen gegenüber **Schl-33.599** gesteigerten Einfluss auf die Eiproduktion und einen verstärkten Effekt auf die Motilität. Diese sank bereits nach 48 h auf ein Niveau, welches mit **Schl-33.599** erst nach 72 h erreicht wurde. Von da aus ging die Motilität dann nochmals um weitere 20% zurück. Phänotypen traten vereinzelt nach 72 h in Form von schwachen Darmdilatationen bei den Weibchen oder ab der 24ten Stunde in Form von starken Tegumentschäden an Männchen und Weibchen auf. Diese waren mitunter letal.

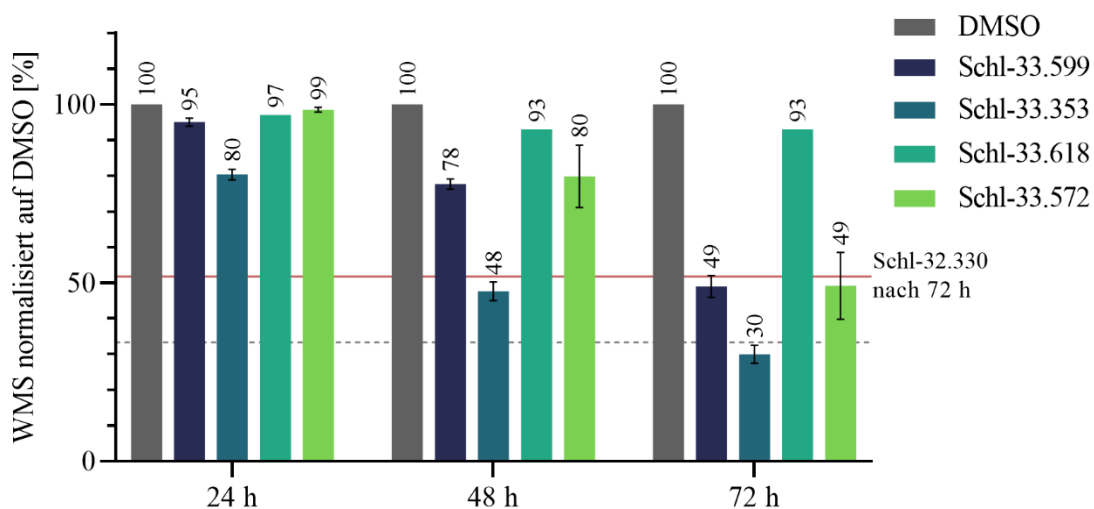
Die Verkleinerung des annelierten 6-Rings durch Verdrängung eines der Sauerstoff-Atome aus dem Ring und damit die Verminderung der Polarität ( $\text{clogP} = 2,53$ ) führte zur Bildung des 2,3-Dihydrobenzo[b]furan-5-sulfonyl-Derivats **Schl-33.572**, das weniger aktiv war. Zwar reduzierte es die Motilität über 72 h in ähnlicher Weise wie **Schl-33.599** und verursachte meist schwere Tegumentschäden sowie vereinzelt schwache Darmdilatationen bei den Weibchen, auf die Eiablage und das Paarungsgeschehen nahm es aber keinen deutlichen bzw. nur einen schwachen Einfluss. Das Indan-5-sulfonyl-Derivat **Schl-33.618** war inaktiv im Vergleich zu **Schl-33.572**, sodass dem Sauerstoffatom bei diesen strukturell ähnlichen Verbindungen durchaus eine positive Wirkung zugeschrieben werden kann (Ausbildung von polaren Wechselwirkungen).

Zusammenfassend war **Schl-33.353** die einzige der vier genannten Verbindungen aus **Tabelle 14** mit anneliertem Phenylsulfonamid-Ringsystem, die bei  $10\ \mu\text{M}$  deutlich aktiver war als das Phenylsulfonamid **Schl-32.330**.

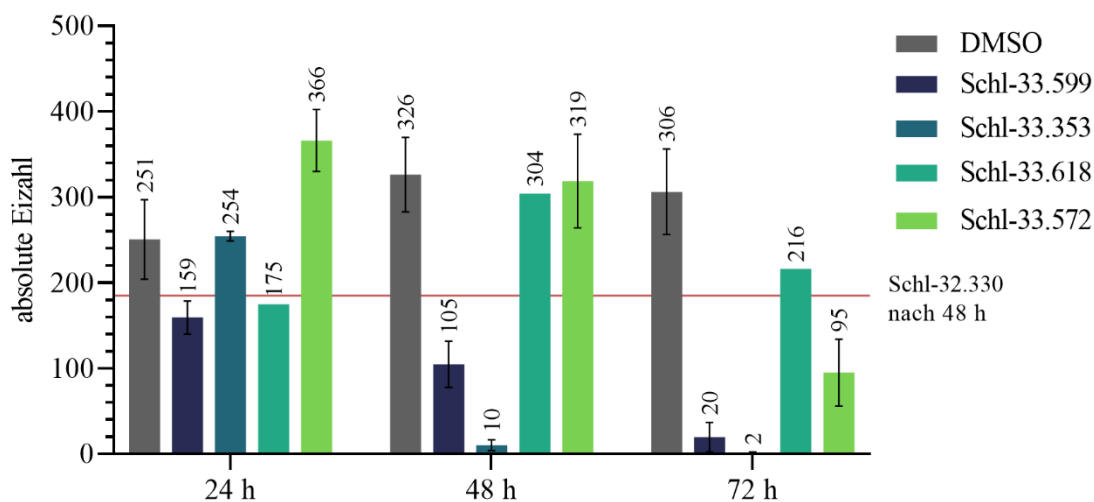


**Abbildung 83:** Exemplarische Phänotypen der aromatischen Sulfonamide gemäß **Tab. 14** bei  $5\ \mu\text{M}$  bzw.  $10\ \mu\text{M}$  nach 72 h; **Schl-33.491:** Strukturverlust („Auswaschung“) eines Weibchens; **Schl-33.353/572:** Warzen/Tegumentbläschen/-anhaftungen an den Weibchen

Da Schistosomen auch über Cyp-Enzyme verfügen, ist eine biotransformative Verstoffwechselung insbesondere der gegenüber einer oxidativen Desalkylierung anfälligen Derivate **Schl-33.353** und **Schl-33.572** durch den Wurm denkbar.<sup>[485]</sup> Dies hätte in beiden Fällen jeweils eine Öffnung des cyclischen Ethers zur Folge. Während der Dioxan-Ring in ein Diphenol-Derivat und Glyoxal zerfallen würde, könnte das Dihydrobenzofuran-Derivat in ein Phenol-Derivat mit Ethanal-Seitenkette übergehen, das dann vermutlich weiterreagieren würde. Ob die Wirkung der beiden Ether-Derivate nun von einem der Transformationsprodukte herrührt oder auf die Derivate **Schl-33.353** und **Schl-33.572** selbst zurückzuführen ist, lässt sich nicht zweifelsfrei beurteilen.

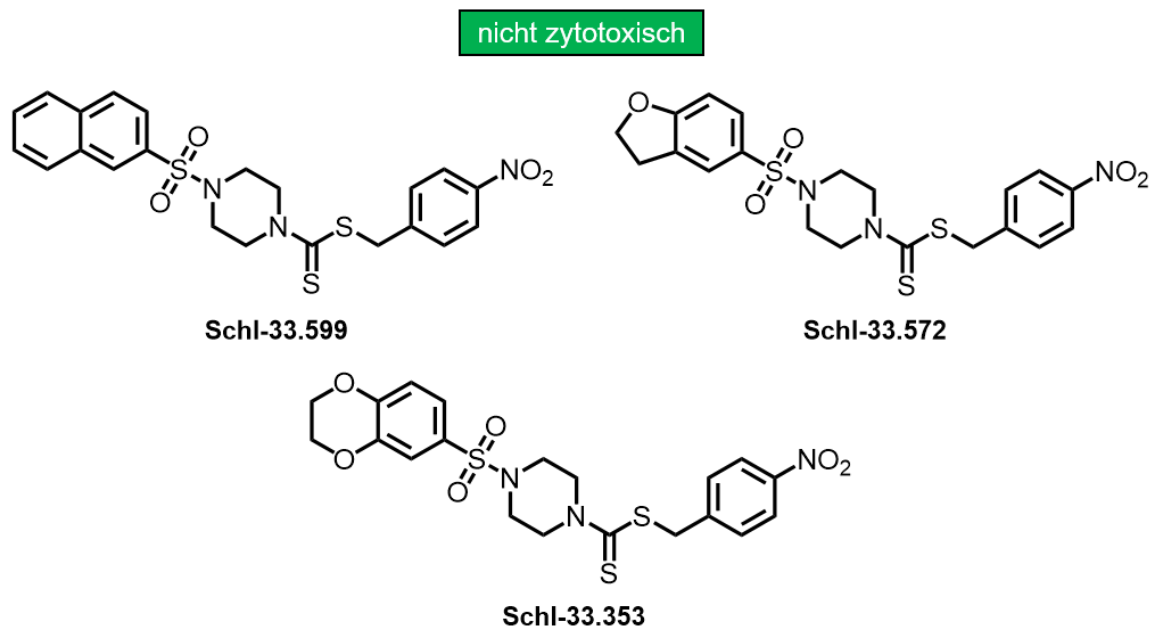


**Abbildung 84:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit dem 2-Naphthyl-sulfonamid-Derivat und der davon abgeleiteten Derivate bei 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 85:** Vergleich der absoluten Eizahlen nach Behandlung mit dem 2-Naphthylsulfonamid-Derivat und der davon abgeleiteten Derivate bei 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden

Von dem antischistosomal aktiven 2-Naphthyl-Derivat und seinen Strukturanaloga waren **Schl-33.599** gegenüber der LS174T-Zelllinie und **Schl-33.353** gegenüber der HepG2-Zelllinie bei 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch. **Schl-33.572** zeigte indessen nur bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keine Zytotoxizität (**Abb. 86**).



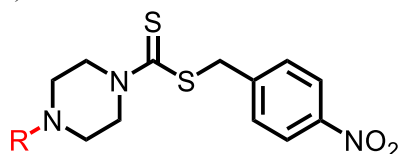
**Abbildung 86:** Zytotoxizität der Verbindung **Schl-33.599** bei 100  $\mu\text{M}$  sowie von **Schl-33.572** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie (zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie) und von Verbindung **Schl-33.353** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie

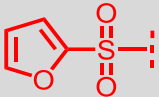
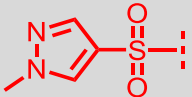
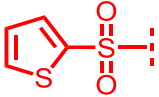
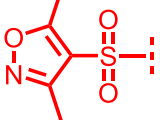
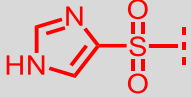
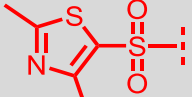
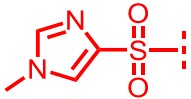
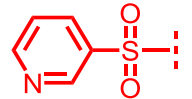
### 3.3.4 Heteroaromatische Sulfonamid-Derivate

#### Ausgewählte Fünfring- und Sechsring-Heterozyklen

Außer der Derivatisierung des Phenylsulfonamids wurde auch der Austausch des Phenylrestes gegen andere aromatische insbesondere 5-Ring-Heterozyklen vorgenommen (**Tab. 15**). So wurden neben einem 2-Furanyl- (**Schl-33.640**), ein 2-Thiophenyl- (**Schl-33.082**), 1*H*-Imidazol-5-yl- (**Schl-33.164**), 1-Methyl-imidazol-4-yl- (**Schl-33.487**), 1-Methyl-1*H*-pyrazol-4-yl- (**Schl-33.540**), 3,5-Dimethylisoxazol-4-yl- (**Schl-33.595**) und ein 2,4-Dimethyl-1,3-thiazol-5-yl-Rest (**Schl-33.594**) eingeführt. Auch ein Sulfonamid mit dem 6-Ring-Heteroaromaten Pyridin wurde in Form eines Pyridin-3-yl-Derivats (**Schl-33.084**) dargestellt.

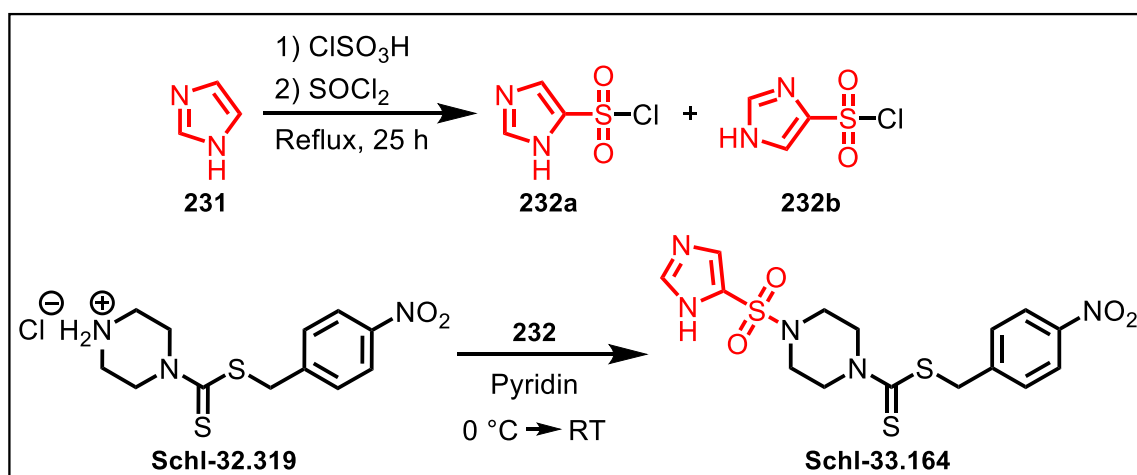
**Tabelle 15:** Strukturformeln und Ausbeuten der heteroaromatischen Sulfonamid-Derivate (\*Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
	45		67
<b>Schl-33.640</b>		<b>Schl-33.540</b>	
	90		55
<b>Schl-33.082</b>		<b>Schl-33.595</b>	
	7*		56
<b>Schl-33.164</b>		<b>Schl-33.594</b>	
	23		87
<b>Schl-33.487</b>		<b>Schl-33.084</b>	

Das 5-Imidazolsulfonyl-Derivat **Schl-33.164** wurde dabei ausgehend von Imidazol (**231**) aufgebaut (**Schema 38**). Dieses wurde mit Chlorsulfonsäure nach einer Reaktionsvorschrift von EERLAND *et al.* in einer elektrophilen aromatischen Substitution zunächst sulfoniert.<sup>[486,487]</sup> Dazu wurde das Imidazol bei 140 °C geschmolzen und die Schmelze tropfenweise mit einem Überschuss von 3 Äquivalenten Chlorsulfonsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h

unter Rückfluss erhitzt. Es folgte die Aktivierung des gebildeten Sulfonsäure-Derivats mittels Thionylchlorid über ein gemischtes Anhydrid, das letztlich unter Bildung von Schwefeldioxid, HCl und des Sulfonsäurechlorids **232** zerfällt. Nach weiteren 5 h des Refluxierens wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen, woraufhin das Produkt **232** in Form zweier Regioisomere ausfiel und abgesaugt werden konnte. Nach dem Trocknen im Hochvakuum wurde das Sulfonsäurechlorid ohne weitere Reinigung mit dem Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** umgesetzt. Das gewünschte 1*H*-Imidazol-5-yl-Derivat **Schl-33.164** konnte in einer Gesamtausbeute von 7% isoliert werden.

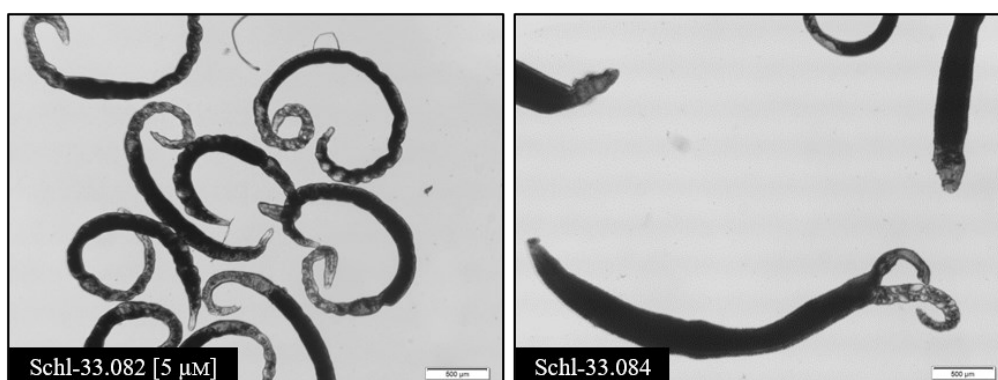


**Schema 38:** Synthese von 4- und 5-Imidazolsulfonylchlorid durch Sulfonierung von Imidazol mit Chlorsulfonsäure und dessen weitere Umsetzung zum Sulfonamid **Schl-33.164**

Die schlechte Ausbeute ist dabei womöglich auf die relativ harschen Reaktionsbedingungen zurückzuführen, also die hohe Reaktionstemperatur, die lange Reaktionszeit und das stark saure Milieu. Auch ist die Hydrolyse eines großen Teils an Reaktionsprodukt neben der der Edukte während der wässrigen Aufarbeitung denkbar. In dem stark sauren Milieu könnte zudem eine Protonierung des Imidazols ( $\text{pK}_\text{S} = 7$ ) erfolgt sein. Das Imidazolium-Salz als solches ist gut wasserlöslich und wäre damit während der Aufarbeitung in die wässrige Phase übergegangen und verworfen worden.

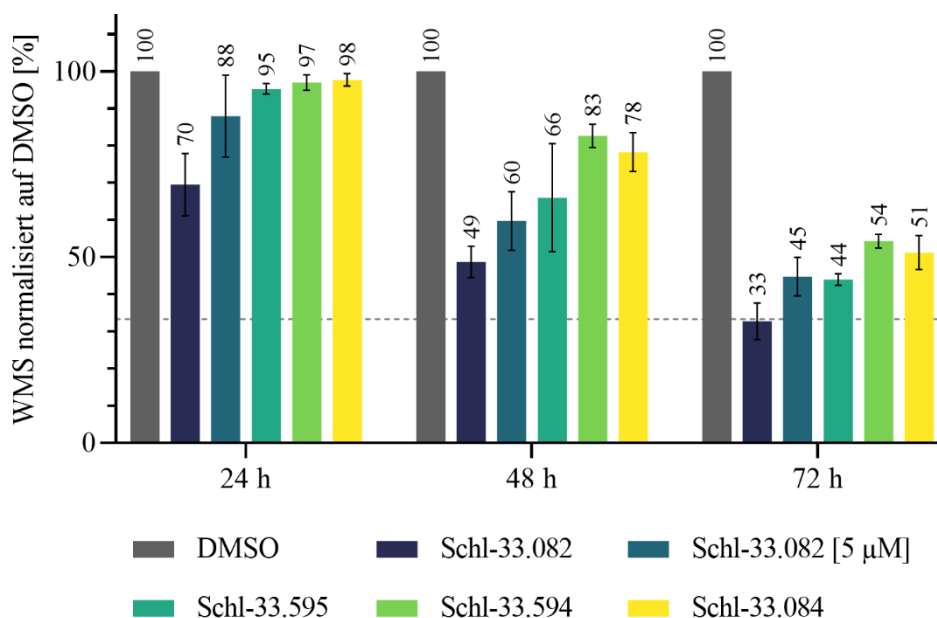
In der Testung wurde keine antischistosomale Aktivität für das 2-Furanyl- (**Schl-33.640**), 1*H*-Imidazol-5-yl- (**Schl-33.164**), 1-Methyl-imidazol-4-yl- (**Schl-33.487**) und 1-Methyl-1*H*-pyrazol-4-yl-Derivat (**Schl-33.540**) bei einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  beobachtet. Das 3,5-Dimethylisoxazol-4-yl- (**Schl-33.595**) und 2,4-Dimethyl-1,3-thiazol-5-yl-Derivat (**Schl-33.594**) waren jedoch aktiv. Dabei gab es Unterschiede hinsichtlich der Intensität der beobachteten Aktivität. Das 3,5-Dimethylisoxazol-4-yl-Derivat wirkte nach 48 h alle Parameter betreffend etwas stärker und zeigte auch nach 72 h bezüglich Motilität und Paarungsstabilität einen deutlich stärker inhibitorischen Effekt von etwa 10% und

40% (**Abb. 88+89**). Beide Verbindungen führten zu Darmdilatationen mittleren Ausmaßes, wobei auch hier der Wirkeintritt beim 2,4-Dimethyl-1,3-thiazol-5-yl-Derivat etwas verspätet auftrat. Das 3,5-Dimethylisoxazol-4-yl-Derivat führte zusätzlich vereinzelt zu schwachen Schäden am Tegument. Bei 5  $\mu\text{M}$  hatte es dann immerhin noch einen schwachen Einfluss auf das Paarungsverhalten der Würmer. Das 2-Thiophenyl-Derivat **Schl-33.082** bewirkte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bereits innerhalb von 48 h die Entpaarung aller Würmer und verursachte zudem den vollständigen Rückgang der Eiproduktion. Zudem war es nach 72 h vereinzelt letal. Als erste Verbindung innerhalb der Klasse der Sulfonamide wirkte das 2-Thiophenyl-Derivat auch unterhalb einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  deutlich. So zeigte es bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  bereits nach 48 h signifikante Effekte auf die Eiproduktion und die Motilität. Das Paarungsverhalten und auch die Eiproduktion waren nach 72 h dann gänzlich gestört und die Motilität um etwa 55% reduziert. Zudem konnten massive Dilatationen des Darms beobachtet werden (**Abb. 87**). Tegumentschäden indessen waren nur bei 10  $\mu\text{M}$  sichtbar. Ab einer Konzentration 4  $\mu\text{M}$  brach die antischistosomale Aktivität schließlich ein.

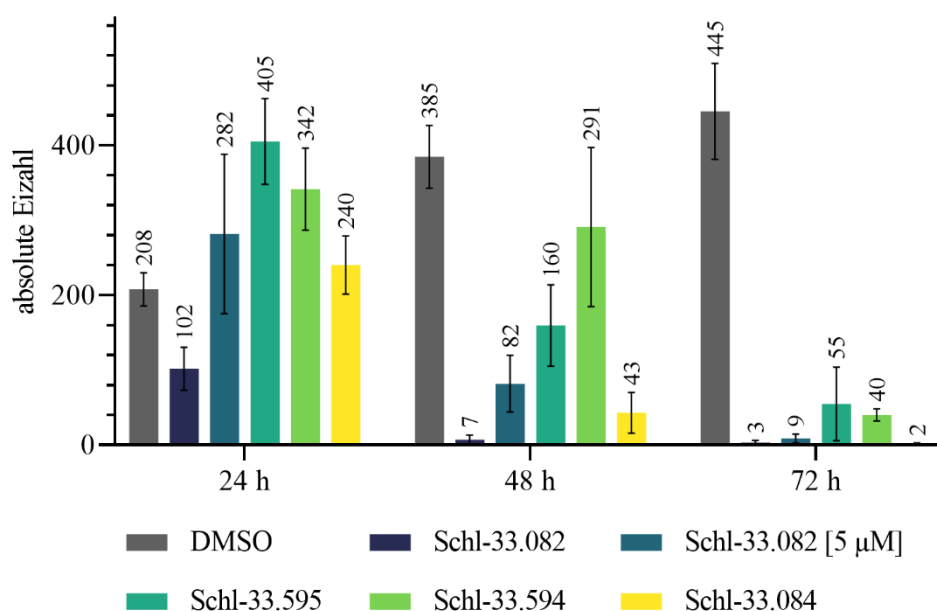


**Abbildung 87:** Exemplarische Phänotypen der heteroaromatischen Sulfonamid-Derivate bei 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h; **Schl-33.082:** ungepaarte, brezelförmig angeordnete Weibchen mit Darmdilatationen (insbesondere auch im Bereich der Reproduktionsorgane/Speiseröhre); **Schl-33.084:** gepaartes Weibchen (annähernd regungslos) mit Darmdilatationen

Das Pyridin-3-yl-Derivat **Schl-33.084** wirkte ebenfalls bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , wobei die Eiproduktion im Gegensatz zu den anderen Parametern bereits nach 48 h von einer Inhibition stark betroffen war. Nach 72 h war dann auch die Motilität um bis zu 50% reduziert und es gab 70% weniger Paare. Zudem wurden erneut vor allem starke Darmdilatationen an den Weibchen beobachtet. Mit einer Reduktion der Konzentration auf 5  $\mu\text{M}$  ging ein vollständiger Verlust der Wirksamkeit einher.



**Abbildung 88:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit heteroaromatischen Sulfonamiden bei 5 µM und 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 89:** Vergleich der absoluten Eizahlen von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit heteroaromatischen Sulfonamiden bei 5 µM und 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden

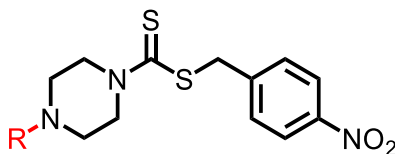
### Strukturvarianten des 2-Thiophenyl-Derivats

Die gute Wirksamkeit des 2-Thiophenyl-Derivats **Schl-33.082** sollte im Anschluss durch weitere Strukturvariationen untersucht werden. So wurde neben dem 2-Thiophenyl- auch das 3-Thiophenyl-Derivat **Schl-33.592** dargestellt, um so die Bedeutung der konstitutionellen Anordnung zu überprüfen. Ferner wurde das heteroaromatische System durch die Annelierung mit einem Benzolring vergrößert (**Schl-33.621**). Ebenso sollte der Einfluss elektronenschiebender wie -ziehender Gruppen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst eine Methylgruppe (**Schl-33.613**) bzw. ein Chlorsubstituent *ortho*-ständig zum Heteroatom



angebracht (**Schl-33.593**). Anschließend wurde der Elektronenzug des Chlorsubstituenten durch einen weiteren Chlorsubstituenten in *meta*-Position zum S-Atom ergänzt (**Schl-33.591**) (**Tab. 16**).

**Tabelle 16:** Strukturformeln und Ausbeuten der Derivate zur Optimierung des 2-Thiophensulfonamid-Derivats

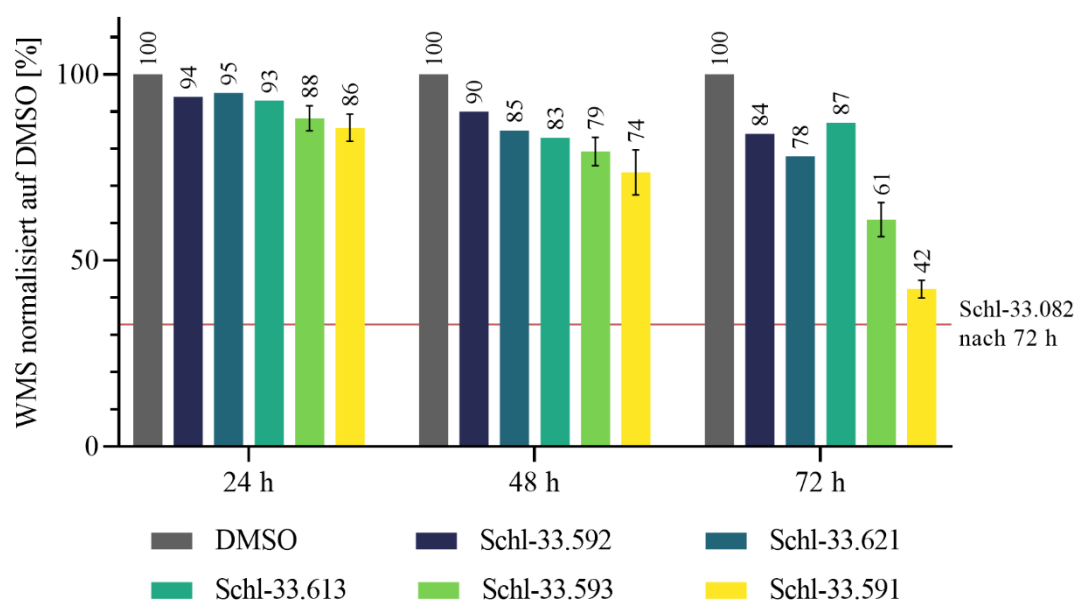


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.592</b>	61	 <b>Schl-33.613</b>	25
 <b>Schl-33.621</b>	67	 <b>Schl-33.593</b>	58
		 <b>Schl-33.591</b>	53

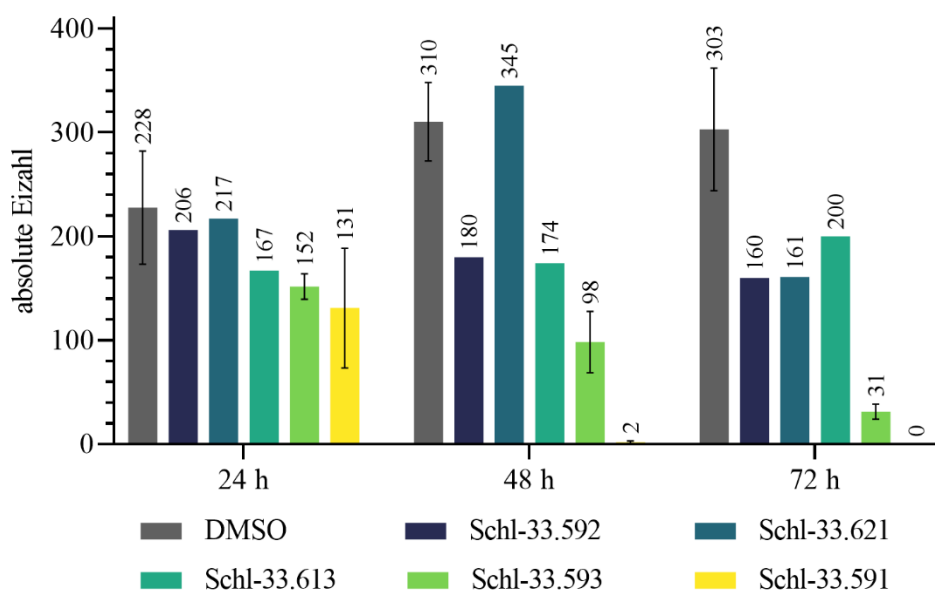
*In vitro* waren sowohl das 3-Thiophenyl- (**Schl-33.592**) als auch das Benzo[b]thiophen-2-yl- (**Schl-33.621**) und 5-Methylthiophen-2-yl-Derivat (**Schl-33.613**) bei der initial getesteten Konzentration von 10  $\mu$ M annähernd unwirksam. Alle hatten lediglich einen schwachen Effekt auf die Paarungsstabilität. Das 5-Chlorthiophen-2-yl- (**Schl-33.593**) und das 4,5-Dichlorthiophen-2-yl-Derivat (**Schl-33.591**) waren hingegen deutlich aktiv. Beide wirkten bereits nach 48 h auf das Paarungsverhalten, wobei die Wirksamkeit des 4,5-Dichlorthiophen-2-yl-Derivats stärker ausgeprägt war. Dies wirkte zudem noch auf die Eiproduktion (**Abb. 91**). Nach 72 h zeigte das 4,5-Dichlorthiophen-2-yl-Derivat neben einer signifikanten Reduktion der Motilität von etwa 60% eine vollständige Entpaarung aller Würmer sowie vollständige Reduktion der Eiproduktion (**Abb. 90**). Bezogen auf die Entpaarung und Motilität war das 5-Chlorthiophen-2-yl-Derivat in seiner Hemmwirkung um etwa 20% weniger stark. Es führte vereinzelt zu schwachen Darmdilatationen an den Weibchen. Das disubstituierte Chlorthiophen hingegen hatte starke Darmdilatationen zur Folge, die auch noch um bis zu 48 h früher auftraten. Bei

einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  führten beide Verbindungen lediglich noch einen schwachen Effekt auf die Paarungsstabilität herbei.

Es zeigte sich also, dass alle dargestellten Verbindungen Strukturvarianten des 2-Thiophensulfonamids **Schl-33.082** weniger aktiv als dieses selbst waren. Der Verlust der Wirksamkeit des Methylthiophen-Derivats gegenüber den chlosubstituierten Derivaten könnte zum einen elektronischer Natur sein, zum anderen aber auch durch die unterschiedliche Biotransformation jener Derivate zustande kommen. Erstgenanntes wird dabei vermutlich bevorzugt an der Methylgruppe oxidiert. Die Chlosubstitution verhindert andererseits eine oxidative Öffnung des Thiophen-Rings, wie diese am unsubstituierten Ring hingegen möglich ist. Initiale Bildung eines 2,3-Epoxids führt demnach über ein Thiolacton oder  $\gamma$ -Thioenal zur  $\gamma$ -Thionocarbonsäure.

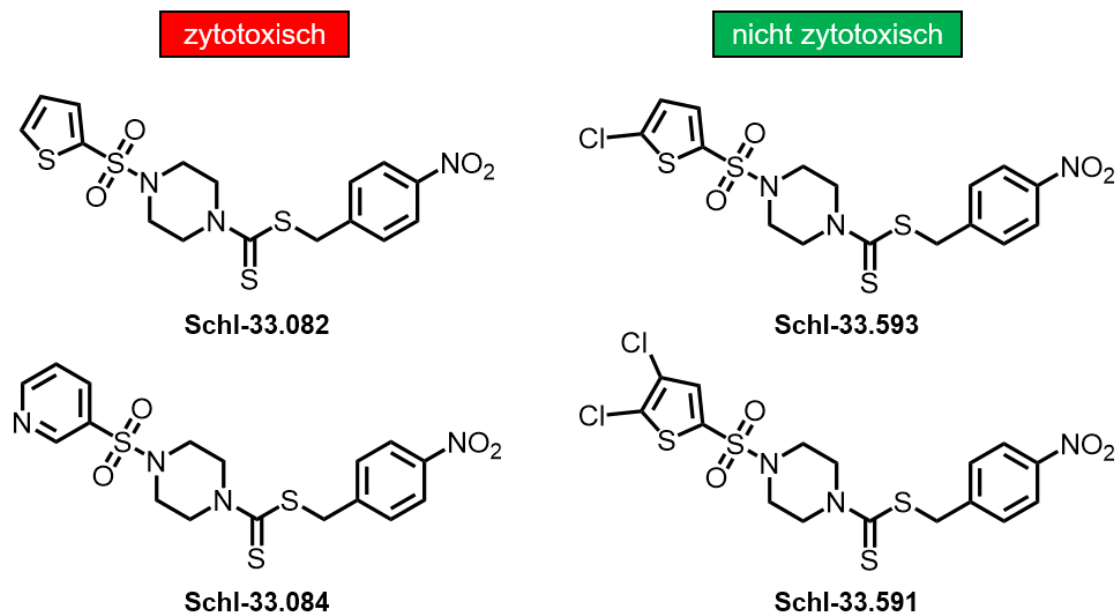


**Abbildung 90:** Vergleich der Motilitäten von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Strukturvarianten des 2-Thiophensulfonamids bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 91:** Vergleich der absoluten Eizahlen von Schistosomen-Paaren nach Behandlung mit den Strukturvarianten 2-Thiophensulfonamids bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden

Während sich das Thiophen-Derivat **Schl-33.082** bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie unauffällig verhielt, zeigten LS174T-Zellen bereits ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  eine starke Anfälligkeit (**Abb. 92**). Das Pyridinyl-Derivat **Schl-33.084** indessen wirkte ab 100  $\mu\text{M}$  zytotoxisch auf HepG2-Zellen. In den Zellkultur-Experimenten blieb das mono-substituierte Chlor-Derivat **Schl-33.593** bis 100  $\mu\text{M}$  unauffällig gegenüber der HepG2-Zelllinie, das disubstituierte Chlor-Derivat **Schl-33.591** hingegen gegenüber der LS174T-Zelllinie.



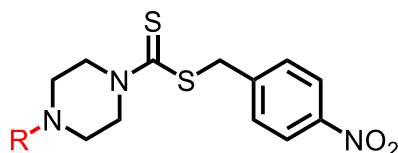
**Abbildung 92:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.084/593** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.082** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie und bei 25  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie; **Schl-33.591** nicht zytotoxisch bis 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie und bis 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie

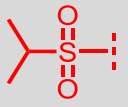
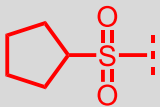
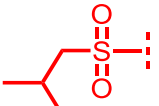
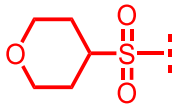
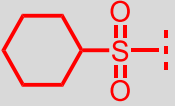
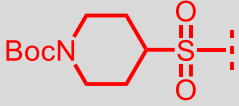
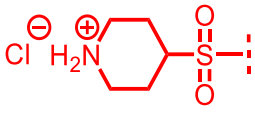
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Substitution am Thiophen-Ring zwar zu einem Rückgang der antischistosomalen Aktivität von 5  $\mu\text{M}$  auf 10  $\mu\text{M}$  führte, die Substitution durch ein Chloratom insbesondere in der 5-Position des 2-Thiophensulfonyl-Restes aber auch mit einer Verminderung des zytotoxischen Potenzials verbunden ist. Am deutlichsten wird dies bei Betrachtung der Daten für die LS174T-Zelllinie. Dort konnte ein Konzentrationssprung von ursprünglich  $c \leq 25 \mu\text{M}$  auf  $c \geq 100 \mu\text{M}$  beobachtet werden.

### 3.3.5 Aliphatische und alizyklische Sulfonamid-Derivate

Da in der Arbeit von P. MÄDER Alkylsulfonamide besonders aktiv waren, wurde außer der Substitution des Phenylsulfonamids und der Darstellung von heteroaromatischen Sulfonamiden auch die Synthese weiterer Alkylsulfonamide in Angriff genommen.<sup>[286]</sup> Um die vorhergehenden Ergebnisse zu validieren, wurde dabei mit der Synthese eines Isopropyl- und Isobutyl-Derivats (**Schl-33.611/610**) begonnen (**Tab. 17**).

**Tabelle 17:** Strukturformeln und Ausbeuten der Alkylsulfonamide sowie Strukturvarianten zur Optimierung des Cyclohexylsulfonamid-Derivats



R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.611</b>	38	 <b>Schl-33.600</b>	14
 <b>Schl-33.610</b>	42	 <b>Schl-33.643</b>	66
 <b>Schl-33.071</b>	41	 <b>Schl-33.619</b>	52
		 <b>Schl-33.645</b>	49

Wie in der Arbeit von P. MÄDER gezeigt werden konnte, war mit zunehmender Kettenlänge ein Aktivitätsverlust verbunden. Es wurde daher vermutet, dass das Isobutyl-Derivat gegenüber dem Isopropyl-Derivat weniger aktiv ist. Auch ein Cyclohexyl-Derivat (**Schl-33.071**) wurde dargestellt, welches im Vergleich zum planaren Phenyl-Derivat **Schl-32.330** über etwas mehr konformative Freiheit verfügt. Der Cyclohexylrest liegt bevorzugt in einer Sessel-Konformation vor und kann über eine Halbsessel-, Twist- und Wannen-Konformation eine Ringinversion vollführen. Gegenüber dem Phenylrest ist er

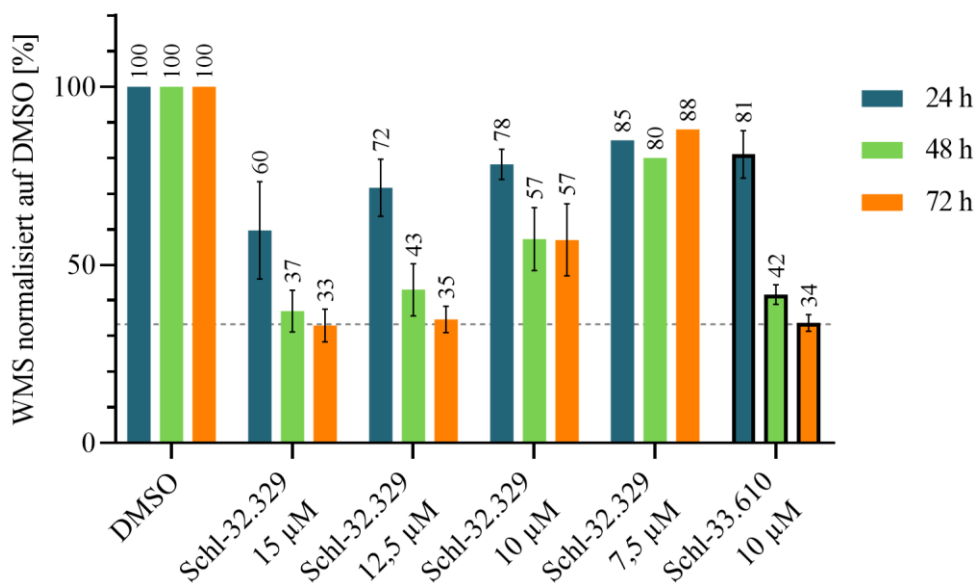
vermehrt zur Ausbildung von hydrophoben Kontakten befähigt, wohingegen der Phenylrest überwiegend auf  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen beschränkt ist.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Testung wichen überraschenderweise von der vorherigen Annahme des Einflusses der Kettenlänge auf die Aktivität ab. Während das verkürzte Isopropyl-Derivat **Schl-33.611** keine antischistosomale Aktivität besaß, war das Isobutyl-Derivat **Schl-33.610** bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M aktiv und führte neben der Entpaarung aller Schistosomen zum kompletten Rückgang der Eizahl (**Abb. 94**). Bereits nach 48 h waren diese Effekte in ihrer Intensität schon überaus deutlich ausgeprägt. Darüber hinaus zeigte das Isobutyl-Derivat nach 72 h vereinzelt letale Effekte (**Abb. 93**). Auch traten starke Darmdilatationen an den Weibchen und mittelstarke Tegumentschäden an den Männchen sowie Weibchen nach etwa 48 h auf. Bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M war indessen nur noch ein schwacher Effekt des Isobutyl-Derivats auf die Eiproduktion festzustellen. Verglichen mit dem 1-(Methylsulfonyl)piperazin-Derivat **Schl-32.329**, das als eines der besten Derivate aus der Arbeit von P. MÄDER hervorging, war das Isobutyl-Derivat stärker wirksam.

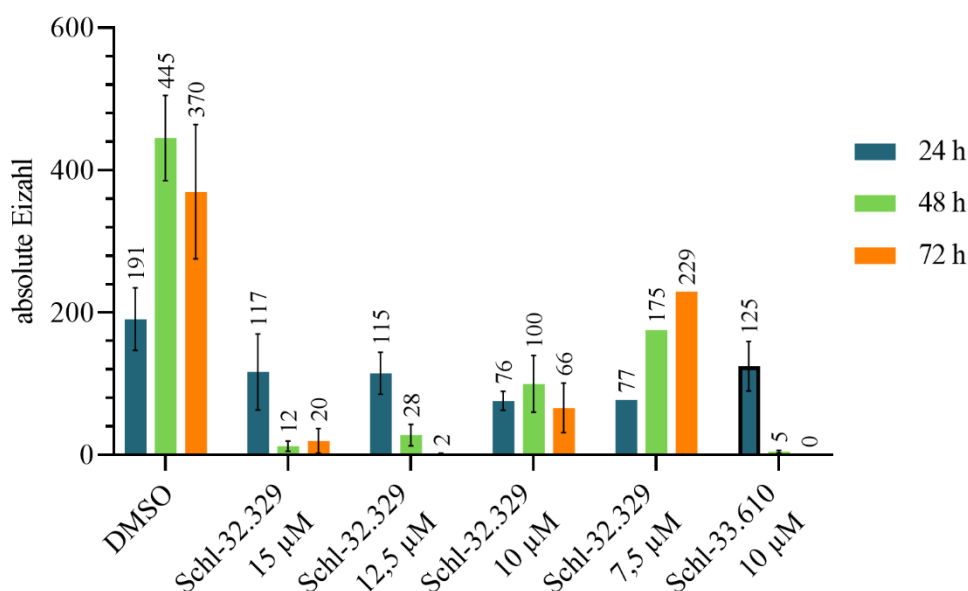
**Schl-32.329** wurde (wie auch andere Derivate) in dieser Arbeit erneut synthetisiert und zum Vergleich nochmals getestet. Während P. MÄDER selbst bei 1  $\mu$ M noch deutliche antischistosomale Effekte wahrnehmen konnte, traten diese hier nicht mehr auf.<sup>[286]</sup> In einer Konzentrationsreihe (ausgehend von 20  $\mu$ M) wurde die Konzentration in 2,5- $\mu$ M-Schritten nach unten titriert, um so die minimale Konzentration zu bestimmen, bei der noch eine signifikante Wirkung auftrat. Diese lag bei etwa 10  $\mu$ M und war damit um den Faktor 10 schwächer. Eine vollständige Entpaarung, die zuvor bei 1  $\mu$ M noch aufgetreten war, erfolgte in diesem Fall ab 12,5  $\mu$ M. Auch die absolute Eizahl war mit 66 Eiern bei 10  $\mu$ M gegenüber 33 Eiern bei 1  $\mu$ M noch nicht ganz so deutlich zurückgegangen. Letale Effekte, welche zuvor noch bei 1  $\mu$ M beobachtet werden konnten, wurden jetzt bei 10  $\mu$ M ebenso wenig sichtbar. Vielmehr wurde eine um etwa 35% reduzierte Motilität beobachtet. Darmdilatationen und Tegumentschäden mittlerer Stärke traten bei 10  $\mu$ M erstmalig auf. Die Stichprobenanzahl der Testungen bei 10  $\mu$ M lag bei vier.

Die Testergebnisse dieser Studie stehen damit im Widerspruch zu früheren Testungen. Dies könnte eventuell auf die weitere Optimierung des Testsystems im Laufe der Zeit zurückzuführen sein. So wurde der WMS beispielsweise erst später eingeführt. Auch sind leichte Schwankungen auf die unterschiedliche Wahrnehmung der jeweiligen Testperson zurückzuführen. Insbesondere letale Effekte bedürfen des genauen Beobachtens der Schistosomen. Eine eindeutige Erklärung für die Diskrepanz ist dies aber nicht. Auch die Zersetzung der Stammlösung konnte ausgeschlossen werden, da diesem Gedanken mittels

analytischer Verfahren (Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie) nachgegangen wurde. Das ursprünglich überaus aktive Dithiocarbamat-Derivat zeigte keine Anzeichen von Abbau und verhielt sich wie eine frisch hergestellte Vergleichsprobe.



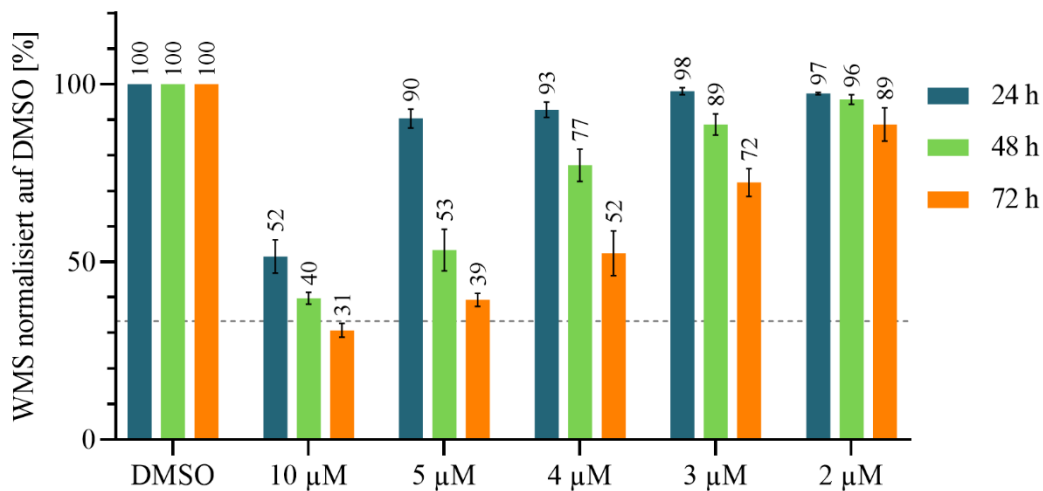
**Abbildung 93:** WMS des 1-(Methylsulfonyl)piperazin-Derivat **Schl-32.329** bei verschiedenen Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden sowie des Isobutyl-Derivats



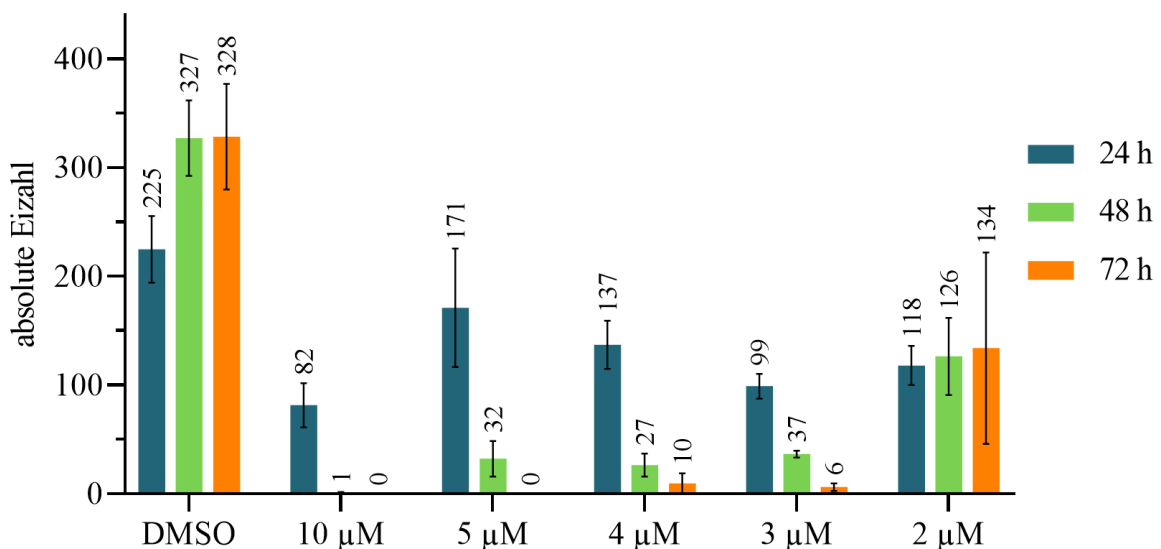
**Abbildung 94:** Absolute Eizahlen des 1-(Methylsulfonyl)piperazin-Derivats **Schl-32.329** bei verschiedenen Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden sowie des Isobutyl-Derivats **Schl-33.610**

Das Cyclohexyl-Derivat **Schl-33.071** zeigte bei der Konzentration von 10 µM vergleichbare Effekte wie das Isobutyl-Derivat **Schl-33.610** einschließlich der Letalität (**Abb. 95**). Im Unterschied zum Isobutyl-Derivat wurden die beobachteten Effekte jedoch schon nach 24 h sichtbar. Alle Parameter waren zu diesem Zeitpunkt bereits um etwa 50% gegenüber der DMSO-Kontrolle verändert. Auch bei einer Konzentration von 5 µM wurden Paarungsverhalten

und Eiproduktion über den Beobachtungszeitraum von 72 h noch vollständig gestört (**Abb. 96**). Bereits nach 48 h war zudem die Motilität um etwa 50% gehemmt. Bis zum Ende der Messung nahm diese dann um weitere 10% ab. Auch bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  führte das Cyclohexyl-Derivat über 48 h noch zu einem deutlichen Rückgang der Eizahl sowie einer signifikanten Entpaarungsrate. Innerhalb von 72 h ging zudem die Motilität um etwa 50% zurück. Bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  wurde lediglich die Eiproduktion innerhalb von 48 h deutlich gehemmt, wohingegen die Paarungsstabilität erst nach 72 h signifikant beeinflusst wurde. Die Motilität erfuhr innerhalb von 72 h eine etwa 30%-ige Reduktion. 2  $\mu\text{M}$  hatten über 72 h hinweg nur noch eine Inhibition der Eiproduktion bis zu 65% zur Folge.



**Abbildung 95:** WMS des Cyclohexylsulfonamids Schl-32.071 bei verschiedenen Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 96:** Absolute Eizahlen des Cyclohexylsulfonamids Schl-32.071 bei verschiedenen Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden

Außer dem Einfluss auf Motilität, Paarungsstabilität und Eiproduktion, führte das Cyclohexyl-Derivat nach nur 24 h bei 10  $\mu\text{M}$  auch zum Auftreten stärkster Darmdilatationen (**Abb. 97**). Davon wie auch von den starken Tegumentschäden, die nach 48 h deutlich auftraten, waren

nicht nur die Weibchen betroffen. Die Darmdilatationen nahmen mit geringerer Konzentration an eingesetztem Inhibitor in ihrer Intensität deutlich ab. Zudem wurden sie immer später sichtbar. So traten sie bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  nur noch vereinzelt, schwach und erst nach 72 h auf. Tegumentschäden waren spätestens ab 4  $\mu\text{M}$  nicht mehr existent.

Aufgrund des guten Abschneidens des Cyclohexyl-Derivats **Schl-33.071** in der *in-vitro*-Testung bis hin zu einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  wurde eine Strukturvariation vorgenommen, die neben einer Ringverengung auch die Einführung von Heteroatomen in der 4-Position des 6-gliedrigen Zyklus vorsah. So wurden ein Cyclopentyl- (**Schl-33.600**), Tetrahydropyran- (**Schl-33.643**), Boc-Piperidin- (**Schl-33.619**) und Piperidin-Hydrochlorid-Derivat **Schl-33.645** dargestellt (**Tab. 17**). Grundlegende Unterschiede bestehen dabei in der räumlichen Ausdehnung des Substituenten. Weiterhin gibt es Unterschiede der physikochemischen Eigenschaften wie etwa der Wasserlöslichkeit und der Art der potenziell möglichen Interaktionen. Während das größere Cyclohexyl-Derivat annähernd spannungsfrei ist, besitzt das kleinere Cyclopentyl-Derivat eine gewisse Spannungsenergie. Es nimmt bevorzugt eine Envelope (Briefumschlag-Konformation) anstelle der Sessel-Konformation des Cyclohexyl-Rests ein. Insbesondere das Tetrahydropyran- ( $\text{clogP} = 1,51$ ) und das Piperidin-Hydrochlorid-Derivat ( $\text{clogP} = 1,11$ ) sind im Vergleich zum Cyclohexyl-Derivat ( $\text{clogP} = 2,68$ ) deutlich polarer und damit hydrophiler. Während der Cyclohexyl-Rest ausschließlich zur Ausbildung von hydrophoben Kontakten befähigt ist, kann das Tetrahydropyran auch als H-Brücken-Donor fungieren. Das Piperidin-Hydrochlorid ( $\text{pK}_s = 11,1$ ) indessen kann auch Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen oder Salzbrücken ausbilden.

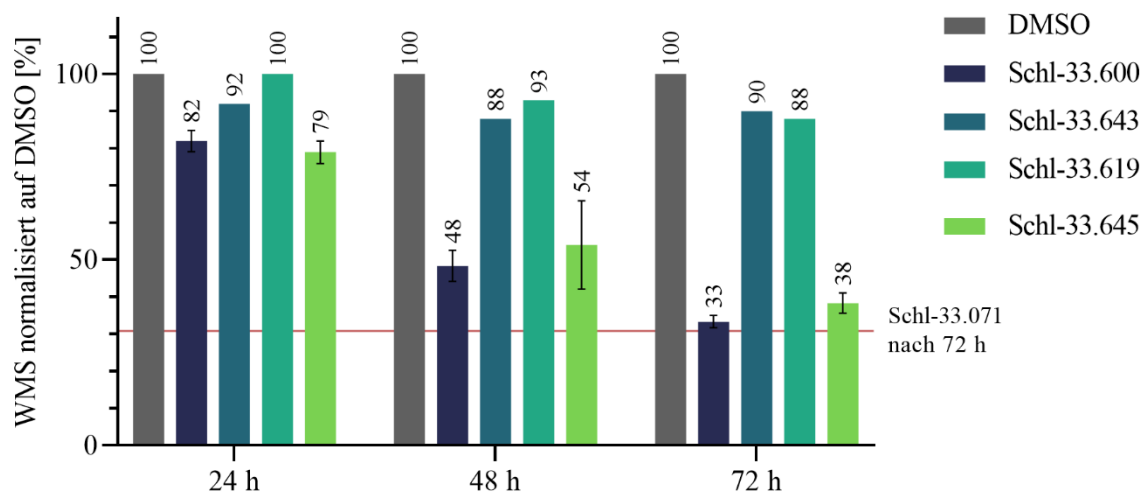
Da in einer ersten Reaktion die gewünschten Produkte nicht isoliert werden konnten, wurde für die Darstellung des Tetrahydropyrans **Schl-33.643** und des Boc-Piperidins **Schl-33.619** Triethylamin als Base und Dichlormethan als Lösungsmittel anstelle des Pyridins verwendet. Die modifizierte Synthese war erfolgreich und führte zu moderaten Ausbeuten von 52% und 66%. Piperidin-Hydrochlorid **Schl-33.645** wurde durch Boc-Entschützung aus **Schl-33.619** erhalten. *In vitro* besaßen weder das Tetrahydropyran- (**Schl-33.643**) noch das Boc-Piperidin-Derivat **Schl-33.619** antischistosomale Aktivität. Das Cyclopentyl-Derivat **Schl-33.600** zeigte bei 10  $\mu\text{M}$  eine dem Cyclohexyl-Derivat **Schl-33.071** vergleichbare Wirkung. Bereits nach 24 h waren 50% der Würmer entpaart und die Eiproduktion um etwa 60% inhibiert (**Abb. 100**). Schwere Darmdilatationen traten zu Tage. Nach 48 h war eine annähernd vollständige Entpaarung und eine etwa 95%-ige Inhibition der Eiproduktion sowie eine 50%-ige Reduktion der Motilität erfolgt (**Abb. 98**). Innerhalb weiterer 24 h kam es dann vereinzelt zur Letalität.



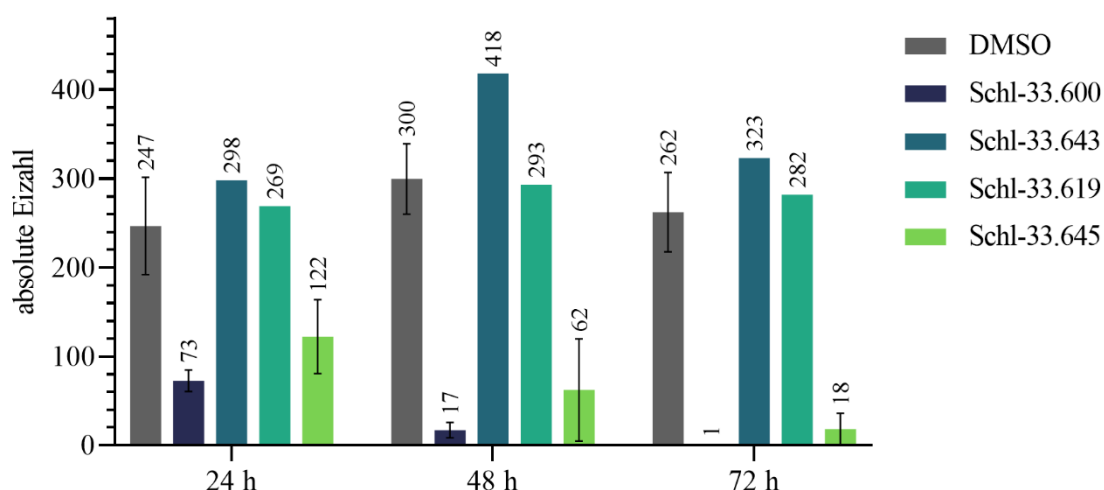
Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  waren über 72 h ausschließlich noch die Eiproduktion und Paarungsstabilität von einer Hemmwirkung betroffen. Der Grad der Inhibition lag hier bei 50% bzw. 70%. Das Piperidin-Hydrochlorid **Schl-33.645**, welches aufgrund seiner Ladung (vernachlässigt man einmal die Einstellung eines Puffergleichgewichts, in deren Verlauf das Piperidiniumion seine positive Ladung verliert) gegenüber dem Boc-Piperidin erwartungsgemäß etwas schlechter aufgenommen und damit eine schwächere Wirksamkeit zeigen sollte, zeigte jedoch ein anderes Verhalten. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führte es nach 24 h zu einem 50%-igen Rückgang der Paarungsstabilität, die nach 72 h dann bis auf 100% angestiegen war. Nach 48 h war zudem die Eiproduktion um etwa 60% gehemmt und es gab schwerste Darmdilatationen. Der Wert nahm innerhalb der nächsten 24 h um weitere 25% zu. Die Motilität indessen war nach 48 h um 45% und nach 72 h um 60% reduziert. Unterhalb von 10  $\mu\text{M}$ , (hier bei 5  $\mu\text{M}$ ) führte das Piperidin-Hydrochlorid über 72 h hinweg weiterhin zur vollständigen Entpaarung und auch die Eiproduktion sank um etwa 65%. Die Motilität blieb hingegen unberührt. Die Wirksamkeit des Piperidin-Hydrochlorid-Derivats steht damit im Widerspruch zur Wirkung des Boc-Piperidin-Derivats, das infolge der antischistosomalen Aktivität des Hydrochlorids zumindest einen zeitverzögerten Wirkeintritt infolge der durch Biotransformation hervorgerufenen Boc-Entschüttung zeigen sollte.



**Abbildung 97:** Exemplarische Phänotypen der aliphatischen Sulfonamid-Derivate bei 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h; **Schl-33.071:** Weibchen mit schwersten Darmdilatationen (Darm auch am distalen Ende aufgebläht, perlenschnurartig); **Schl-33.610:** reifenförmig aufgerolltes Männchen mit schweren Darmdilatationen und Strukturverlust; **Schl-33.610:** zwei hakenförmig angeordnete Weibchen mit Darmdilatationen (lokal begrenzt, nicht den gesamten Verdauungstrakt betreffend)

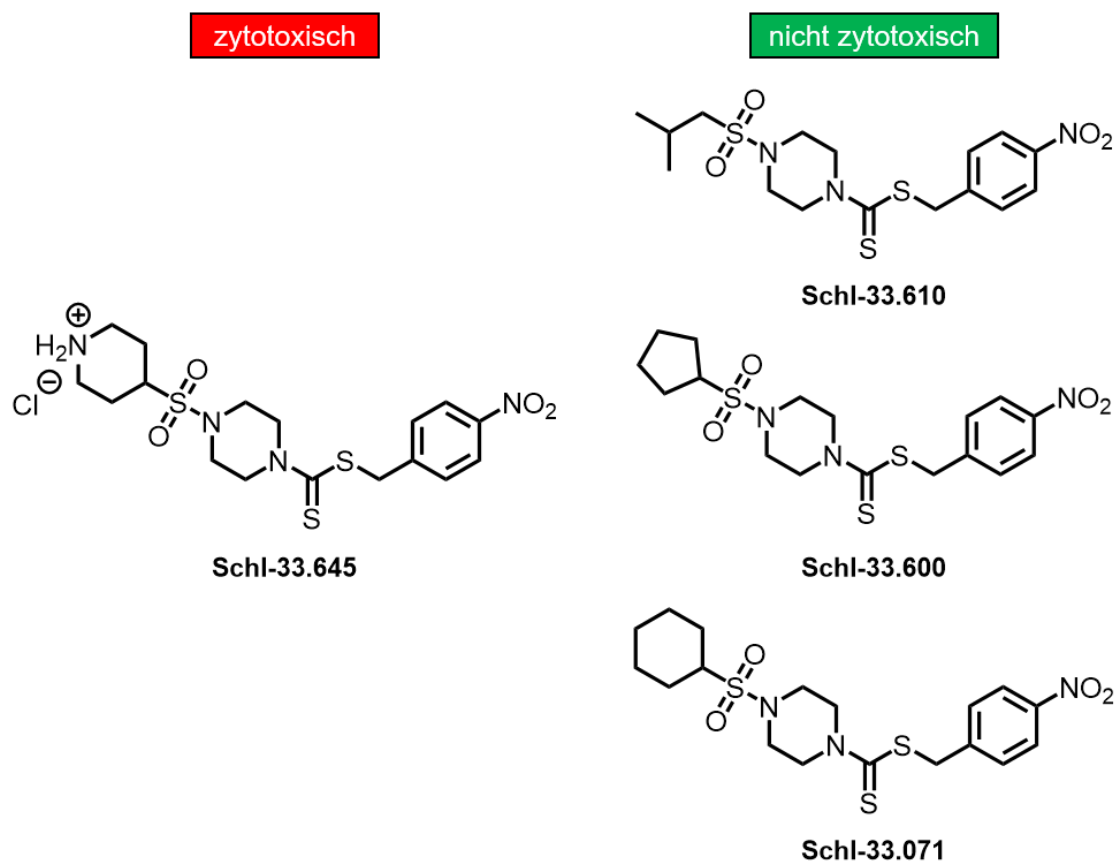


**Abbildung 98:** WMS der Derivate zur Strukturvariation des Cyclohexyl-Derivats bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



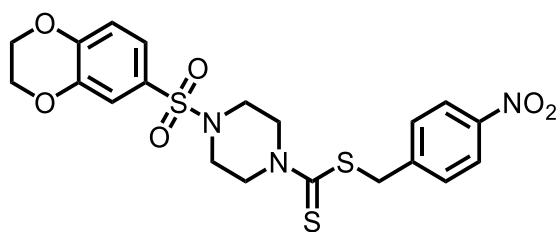
**Abbildung 99:** Absolute Eizahlen der Derivate der Strukturvariation des Cyclohexyl-Derivats bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden

Für weitere Arbeiten ist die Darstellung des 4-Hydroxypiperidinsulfonamids als mögliches Biotransformationsprodukt von **Schl-33.071** anzuregen. Unklar ist, ob das durch die Oxidation des 6-Rings erhaltene Produkt ebenso aktiv ist, wie das beim Praziquantel der Fall ist. Dort trägt das Oxidationsprodukt nämlich einen entscheidenden Anteil zur Aktivität bei.<sup>[172]</sup> Die Zellviabilität der HepG2-Zellen wurde durch die aliphatischen Sulfonamide **Schl-33.071** und **Schl-33.600** auch bei 100  $\mu\text{M}$  nicht beeinträchtigt (**Abb. 100**). Das Isobutyl-Derivat **Schl-33.610** war gegenüber den HepG2- und LS174T-Zellen bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch. Das Piperidin-Hydrochlorid **Schl-33.645** indessen war ab 50  $\mu\text{M}$  zellschädigend.

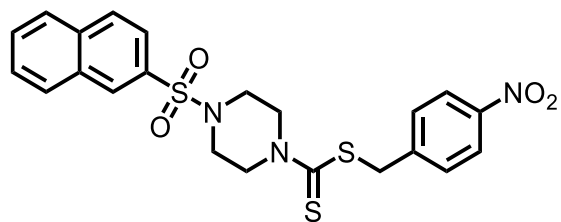


**Abbildung 100:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.645/610** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie gegenüber der LS174T-Zelllinie und von **Schl-33.600/071** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie

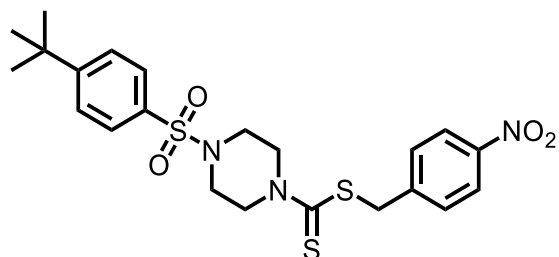
Damit ergeben sich schließlich die in **Abbildung 101** gezeigten Sulfonamid-Derivate, die neben den monosubstituierten Phenylsulfonamid-Derivaten aus **Abbildung 74** sowohl bei 10  $\mu\text{M}$  antischistosomal aktiv und bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch gegenüber mindestens einer der beiden untersuchten Zelllinien waren. Hierzu zählen von den aromatischen Sulfonamiden das 4-*tert*-Butylphenyl-Derivat **Schl-33.081**, das 2-Naphthyl-Derivat **Schl-33.599** und das 2,3-Dihydrobenzo-1,4-dioxin-Derivat **Schl-33.353**. **Schl-33.599** ist dabei das am schwächsten wirksame Derivat. Gefolgt wird es von **Schl-33.353**. **Schl-33.081** ist mit einer immerhin noch schwachen Wirksamkeit bis 5  $\mu\text{M}$  am aktivsten. Von den heteroaromatischen Sulfonamiden sind das 5-Chlorthiophen-Derivat **Schl-33.593** und das 4,5-Dichlorthiophen-Derivat **Schl-33.591** zu nennen. **Schl-33.591** wirkte dabei stärker auf die Schistosomen als dies **Schl-33.593** tat. Der Serie von aliphatischen und alizyklischen Sulfonamiden entstammen das Cyclopentyl-Derivat **Schl-33.600** und das Cyclohexyl-Derivat **Schl-33.071**. Das Cyclohexyl-Derivat zeigte dabei gegenüber dem Cyclopentyl-Derivat eine verbesserte antischistosomale Aktivität bis 3  $\mu\text{M}$  gegenüber 10  $\mu\text{M}$ .



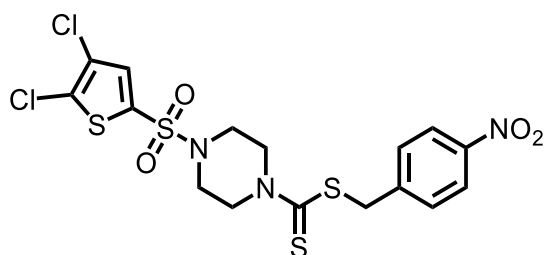
**Schl-33.353** [10  $\mu$ M]



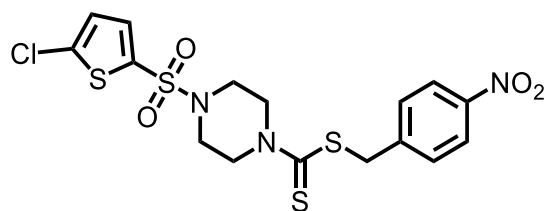
**Schl-33.599** [10  $\mu$ M]



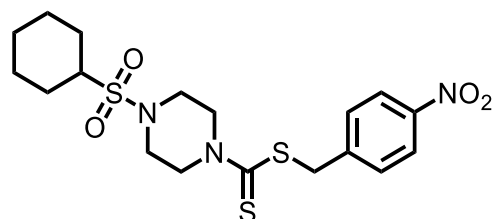
**Schl-33.081** [5  $\mu$ M]



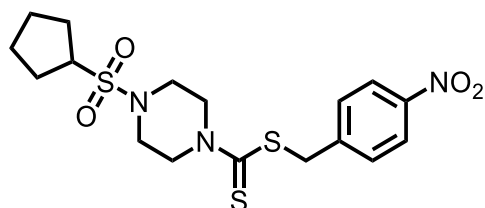
**Schl-33.591** [10  $\mu$ M]



**Schl-33.593** [10  $\mu$ M]



**Schl-33.071** [3  $\mu$ M]



**Schl-33.600** [10  $\mu$ M]

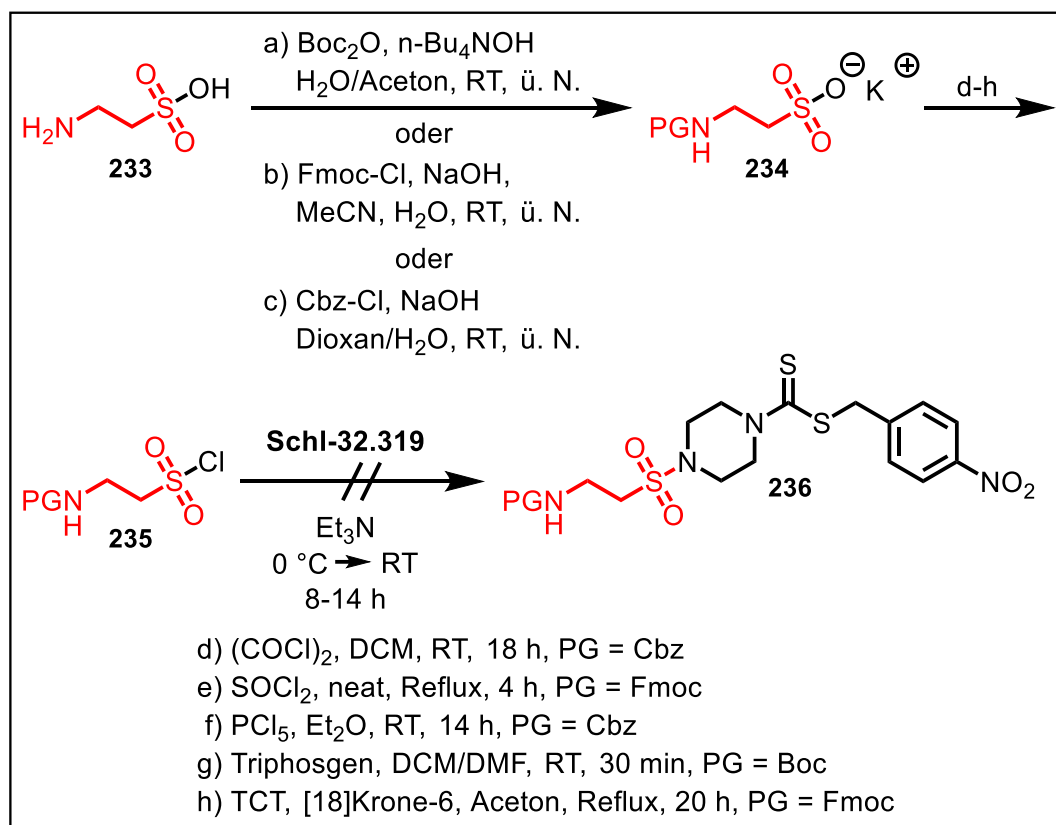
**Abbildung 101:** Strukturformeln der wirksamsten und bis 100  $\mu$ M nicht zytotoxischen Derivate weiterer aromatischer Sulfonamide, der heteroaromatischen Sulfonamide sowie der alizyklischen Sulfonamide und deren jeweils niedrig wirksamste Konzentration

### 3.3.6 Aliphatische Sulfonamid-Derivate mit polarer Kopfgruppe

Ein besonderes Augenmerk wurde auch auf die Einführung einer polaren Kopfgruppe am Ende der aliphatischen Kette des Sulfonamids gelegt. Zunächst wurde eine Aminogruppe präferiert. Diese sollte einen maximalen Abstand von zwei Kettengliedern zur SO<sub>2</sub>-Gruppe haben, da ab einer Alkylkettenlänge von  $n \geq 4$  ein Einbruch der antischistosomalen Aktivität zu erwarten war. Eine kürzere Kette ( $n = 1$ ), also das Einbringen einer Aminogruppe  $\alpha$ -ständig zur Sulfonsäure, wurde als weniger günstig erachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass etwaige Produkte, insbesondere eingebunden in ein Peptidgrundgerüst, weniger stabil sind und leicht fragmentieren.<sup>[488–490]</sup> Im Falle eines ( $\alpha$ -Aminomethylsulfonyl)piperazinamid-Derivats würde dies zur Bildung von Methanimin, Schwefeldioxid und eines Piperazin-Derivats führen.

Die Synthese von Aminosulfonäuren bringt aber zwei Probleme mit sich. Erstens ist die Sulfonsäuregruppe besonders in ihrer deprotonierten Form durch die gute Mesomeriestabilisierung ziemlich reaktionsträge. Eine Aktivierung in Form eines Sulfonsäurechlorids ist daher nötig. Dies erfordert stark elektrophile Reaktionspartner und oftmals harsche Reaktionsbedingungen. Zweitens macht die Einführung der für Aminosäuren gebräuchlichen Schutzgruppe und die Isolierung der *N*-geschützten Aminosulfonsäure aufgrund ihrer Polarität Schwierigkeiten. Die Schutzgruppe wird benötigt, um einen gleichzeitigen Angriff der Aminogruppe auf das Halogenierungsmittel und damit eine Halogenierung in der Seitenkette zu unterbinden. Für die Synthese wurden unterschiedliche Ansätze der Schutzgruppenstrategie verfolgt (**Schema 39**). Taurin (**233**) wurde mit Natriumhydroxid oder Tetrabutylammoniumhydroxid sowohl Boc-, Fmoc- als auch Cbz-geschützt dargestellt.<sup>[491,492]</sup> Während die Boc-Schutzgruppe säurelabil ist und damit im Zuge einer Halogenierungsreaktion, bei der zumeist auch HCl als Nebenprodukt anfällt, abgespalten wird, ist die Fmoc-Schutzgruppe basenlabil. Sie zerfällt nach initialer Deprotonierung nach einem E1<sub>cb</sub>-Mechanismus zu einem quasi-aromatischen System. Die Cbz-Gruppe kann mit Wasserstoff an Palladium entfernt werden. Auch eine Schützung als Trifluoracetamid, welches ebenfalls säurestabil ist und zum Beispiel mit Natriumcarbonat in Methanol bei Raumtemperatur wieder abgespalten werden kann oder die Umsetzung der Amino-Gruppe zu einem Phthalimid, das letztlich über eine Hydrazinolyse unter Ausnutzung des  $\alpha$ -Effekts zum primären Amin zurückreagiert, sind an dieser Stelle denkbar.<sup>[493]</sup>

Die geschützten Aminosulfonsäuren **234** wurden mittels Extraktion gereinigt oder nach Lyophilisierung erhalten und direkt weiter zu den Sulfonäurechloriden **235** umgesetzt. Dabei wurden wiederum verschiedene Ansätze der Aktivierung vorgenommen.



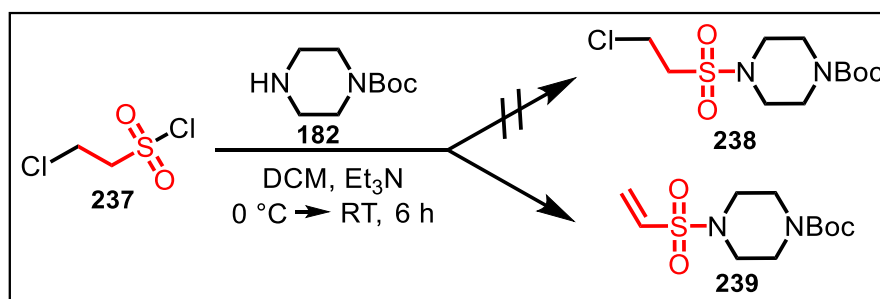
**Schema 39:** Gescheiterte Versuche zur Darstellung des Dithiocarbamats **236** aus Aminoethansulfonsäure

CBz-geschütztes Taurin wurde (in Analogie zu 2-Morpholinethan-1-sulfonsäure) nach einer Synthese von DIAZ *et al.* mit Oxalylchlorid bei Raumtemperatur halogeniert.<sup>[494]</sup> Neben der aktivierten Sulfonsäure entstehen dabei Kohlenstoffmonoxid und -dioxid. Das Boc-geschützte Taurin wurde nach LESZCZYNSKA *et al.* mit Triphosgen in einem Gemisch aus Dichlormethan und Dimethylformamid umgesetzt.<sup>[495]</sup> Die Reaktion verläuft unter Bildung von Phosgen und Kohlenstoffdioxid. Fmoc-Taurin wurde nach HUMLJAN *et al.* mit Thionylchlorid unter *neat*-Bedingungen zum Sieden erhitzt.<sup>[496]</sup> Weiterhin wurde in Analogie zu GIORDANO *et al.* CBz-geschütztes Taurin mit  $\text{PCl}_5$  in Diethylether bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein instabiles Intermediat entsteht, das unter Bildung von Phosphoroxychlorid zerfällt.<sup>[497]</sup> Pyridin wirkt dabei reaktionsfördernd und wurde dem Reaktionsansatz in katalytischen Mengen zugefügt.<sup>[498]</sup> Außer den konventionellen Methoden zur Aktivierung der Sulfonsäure wurde auch eine neuere Methode von BLOTNY *et al.* genutzt, bei der die Sulfonsäure mit 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (Cyanurchlorid) in refluxierendem Aceton unter pH-neutralen Reaktionsbedingungen behandelt wird.<sup>[499]</sup> Nach nucleophilem Angriff des Sulfonats auf das Trichlor-*S*-triazin entsteht Dichlorhydroxy-*S*-triazin und das Sulfonsäurechlorid. Damit wurden unterschiedlich starke Halogenierungsmittel eingesetzt und verschieden lange Reaktionszeiten sowie Reaktionstemperaturen getestet. Auch das Lösungsmittel wurde allumfänglich variiert. Die resultierenden Sulfonsäurechloride **235**, die *via* Dünnschichtchromatographie nachgewiesen

wurden, wurden ohne weitere Reinigungsschritte mit Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** abgefangen. Dennoch konnte in keinem Fall das gewünschte Dithiocarbamat **236** isoliert werden. Selbst das entschützte Produkt trat im Falle der Fmoc-geschützten 2-Aminoethansulfonsäure nicht auf, wo eine Entschützung während der Kondensation mit dem Piperazin denkbar ist. An dieser Stelle wurde der Ansatz verworfen und nicht weiterverfolgt.

### Alternativ-Variante A zur Einführung polarer Kopfgruppen

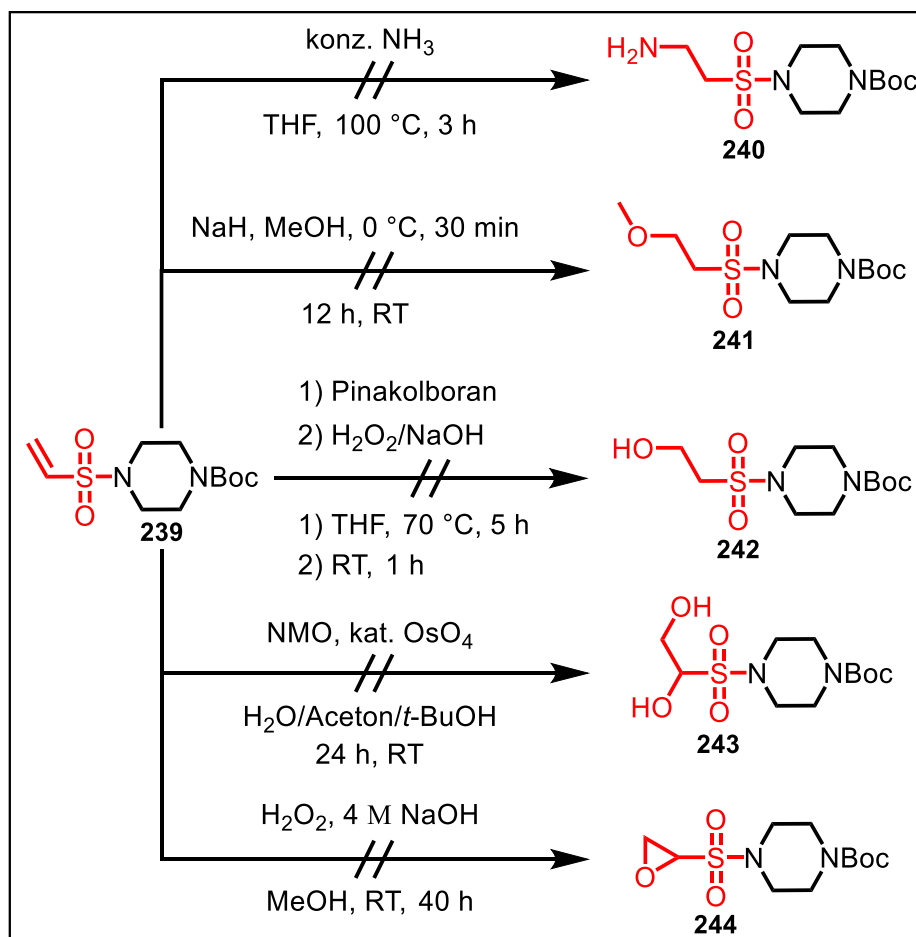
Eine alternative Synthesevariante, ein Sulfonamid mit polarer Kopfgruppe darzustellen, ging von (2-Chlorethyl)sulfonylchlorid (**237**) aus, das nach PATEL *et al.* mit Boc-Piperazin (**182**) und Triethylamin in das Boc-geschützte (2-Chlorethyl)sulfonylpiperazin (**238**) überführt werden sollte.<sup>[500]</sup> Geplant war, den Chlorsubstituent an der Ethylseitenkette im Folgenden dann in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion gegen ein Stickstoff- oder Sauerstoff-Nucleophil auszutauschen. Aufgrund der erhöhten CH-Acidität in  $\alpha$ -Position zur Sulfonyl-Gruppe kam es allerdings zur Eliminierung und Bildung von Vinylsulfonylpiperazin **239** (Schema 40).



**Schema 40:** Beobachtete Nebenreaktion bei der Bildung von (2-Chlorethyl)sulfonylpiperazin **238**

Das unverhoffte Auftreten der Vinylgruppe eröffnete jedoch mehrere Synthesemöglichkeiten (Schema 41). Nach GIDDENS *et al.* wurde das Vinylsulfonylpiperazin **239** mit Ammoniak in einer Aza-Michael-Additionsreaktion bei 100 °C refluxiert.<sup>[501]</sup> Das gewünschte primäre Amin **240** konnte jedoch nicht erhalten werden. Das trifft auch auf eine Oxa-Michael-Additionsreaktion bei Raumtemperatur mit Natriummethanolat nach FINLAY *et al.* zu, bei der es zu keiner Etherbildung (**241**) kam.<sup>[502]</sup> Gemäß SREBNIK *et al.* wurde das Vinylsulfonamid anstelle eines Vinylphosphonsäureesters, der über eine elektronenarme Doppelbindung verfügt, in einer Hydroborierungsreaktion mit Pinakolboran bei 70 °C umgesetzt.<sup>[503]</sup> Das Bor-Atom sollte dabei im Zuge einer elektrophilen Addition an das sterisch weniger gehinderte Ende der Doppelbindung (anti-Markownikow) addieren unter Bildung eines Trialkylborans. Dieses sollte daraufhin oxidativ über einen 1,2-Alkyl-Shift zum primären Alkohol **242** gespalten werden. Eine Reaktion trat unter den angegebenen Reaktionsbedingungen jedoch nicht ein, weshalb die Doppelbindung im nächsten Schritt nach einer Synthesevorschrift von DUPAU *et al.* mit katalytischen Mengen Osmiumtetroxid bei Raumtemperatur dihydroxyliert werden sollte.<sup>[504]</sup>

Die Reaktion beginnt dabei mit einer 1,3-dipolaren Cycloaddition des Oxidationsmittels an die Doppelbindung. Es entsteht ein fünfgliedriger Ring, der Diester der Osmium(VI)-säure, welcher in Anwesenheit von Wasser gespalten wird und das Endprodukt **243** freisetzt. Durch das Cooxidans *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) wird die Osmium(VI)-säure dabei wieder in das achtwertige Osmiumtetroxid überführt. Auch hier blieb ein Umsatz des Eduktes aus. Ferner wurde noch eine Epoxidierung mit Wasserstoffperoxid nach GEVONDYAN *et al.* durchgeführt.<sup>[505]</sup> Durch Zugabe von Natriumhydroxid sollte sich dabei ein Hydroperoxidanion bilden, das als Nukleophil die elektronenarme Doppelbindung angreift und unter Abspaltung eines Hydroxidions den 3-Ring **244** ergibt. Dieser wäre sowohl im sauren als auch im basischen Milieu unter Bildung des Diols **243** zu öffnen. Das Epoxid **244** wurde jedoch ebenso wenig gebildet.



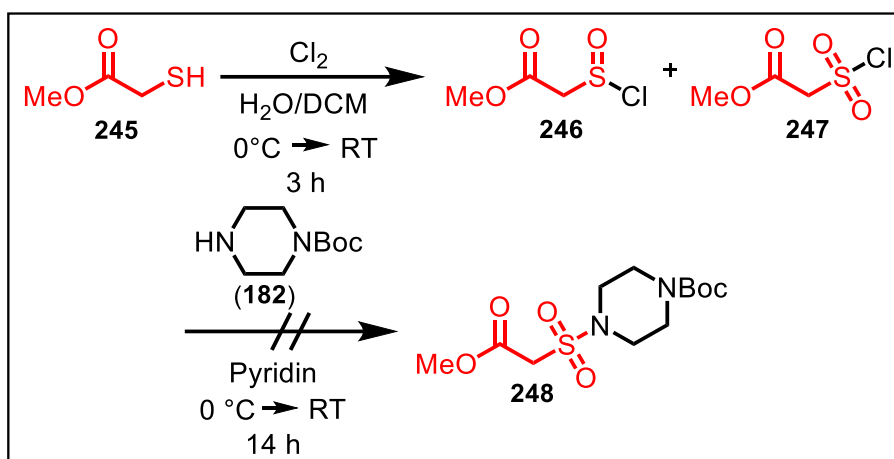
**Schema 41:** Gescheiterte Versuche zur Einführung einer polaren Kopfgruppe in der Alkylseitenkette ausgehend vom Vinylsulfonamid **235**

### Alternativ-Variante B zur Einführung polarer Kopfgruppen

Für einen anderen Ansatz zum Einführen einer polaren Gruppe in die Alkylseitenkette des Sulfonamids ging man von Mercaptoessigsäuremethylester (**245**) aus (**Schema 42**). Dieser wurde mit Chlorgas, das *in situ* aus Kaliumpermanganat und konzentrierter Salzsäure erzeugt

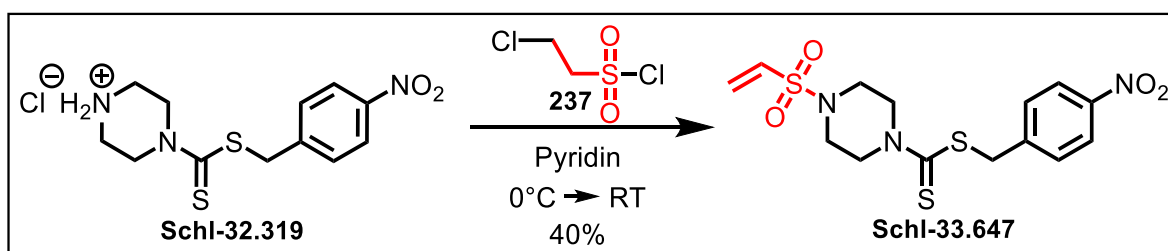


wurde, gemäß einer Vorschrift von NING *et al.* bei 0 °C zum Chlorsulfonylessigsäuremethylester (**247**) oxidiert.<sup>[506]</sup> Dabei wurde vermutlich auch das Chlorsulfin-Derivat **246** gebildet. Die organische Phase wurde letztlich separiert und unter Basenkatalyse mit Boc-Piperazin (**182**) nach bekannter Methode weiter umgesetzt. Das gewünschte Sulfonamid **248** und die daraus resultierende Säure sowie der durch Reduktion denkbare Alkohol wurden jedoch nicht erhalten.



**Schema 42:** Gescheiterter Versuch zur Darstellung des ((2-Methoxy-2-oxoethyl)sulfonyl)piperazin-Derivats aus Mercaptoessigsäuremethylester durch Oxidation mit Chlor

Weitere Anstrengungen zur Synthese eines Alkylsulfonamids mit einer polaren Gruppe, wurden nicht unternommen. Die ursprünglich unerwünschte Vinylgruppe wurde später gezielt in ein Dithiocarbamat eingebaut. Zum einen war von Interesse, inwieweit ein ungesättigtes System, an dem Folgereaktionen prinzipiell denkbar sind, hinsichtlich der antischistosomal Aktivität geduldet wird. Zum anderen sind Vinylsulfonamide als Cystein-Protease-Inhibitoren gegen *S. mansoni* aus der Literatur bekannt und eine Wirkung daher nicht unwahrscheinlich.<sup>[507,508]</sup> Die Synthese erfolgte durch Reaktion von **Schl-32.319** mit 2-Chlor-ethansulfonsäurechlorid in Pyridin und damit simultaner Kondensation des Sulfonsäurechlorids **237** mit dem Amin und Eliminierungsreaktion am Chloralkan zum Alken. Langwierige Reinigung ergab schließlich **Schl-33.647** in mittelmäßiger Ausbeute von 40% (**Schema 43**). Die erhoffte Wirkung des Vinyl-Derivats blieb jedoch aus. Nur die Paarungsstabilität wurde innerhalb der ersten 48 h deutlich beeinflusst.

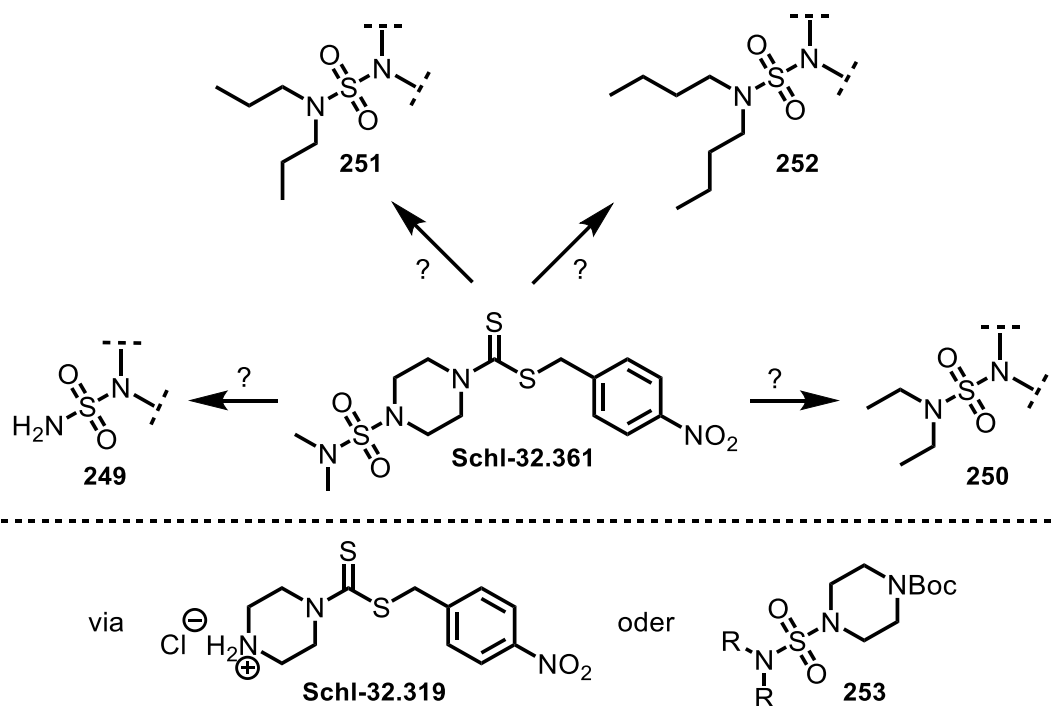


**Schema 43:** Synthese zur Darstellung des Dithiocarbamts mit Vinyl-Sulfonamid-Einheit

### 3.4 Schwefelsäurediamide

#### 3.4.1 Sekundäre Amine als Ausgangssubstanz

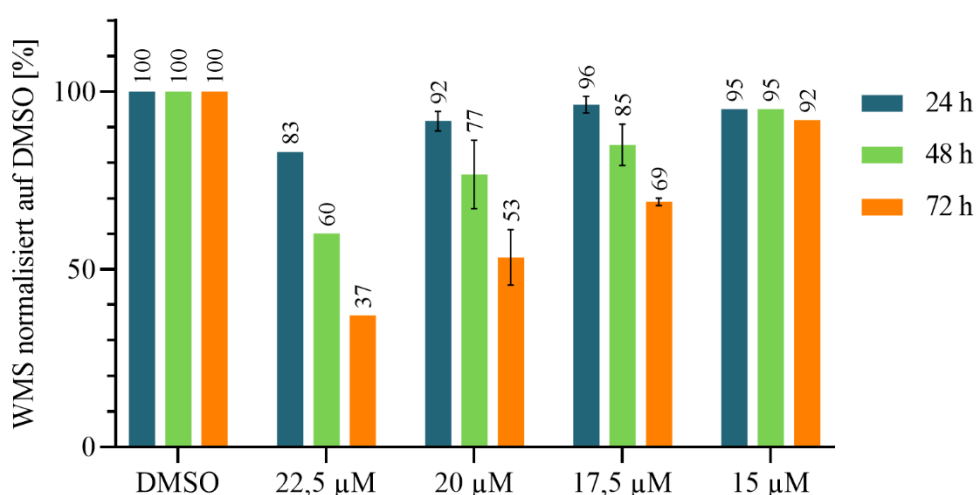
Wie in der Einleitung dargestellt, wurde neben der Einführung einer Sulfonylgruppe in 4-Position des Piperazin-Rings auch die Einführung einer Sulfamoylgruppe geduldet. Diese wurde ausgehend von Sulfamoylchlorid, das mit Pyridin als basischem Katalysator umgesetzt wurde, eingeführt. Da die Zahl kommerziell erhältlicher Sulfamoylchloride aber begrenzt ist, galt es, eine Synthesemethode zur Darstellung weiterer unsymmetrischer Schwefelsäurediamide zu entwickeln. Diese sollte eine möglichst große Substratbandbreite aufweisen und somit auch das Einbringen komplexer beziehungsweise weniger nucleophiler Reste ermöglichen. Ausgehend von *N,N*-Dimethylsulfamoylpiperazinamid-Derivat **Schl-32.361** sollten zunächst das di-substituierte Schwefelsäurediamid-Derivat **249** sowie die tetra-substituierten Schwefelsäurediamide **250-252**, welche zweifach symmetrisch alkyliert sind, hergestellt werden (**Abb. 102**). Die Synthese der Dithiocarbamate mit Sulfamid-Teilgerüst sollte dabei entweder direkt vom Piperazin-Hydrochlorid-Derivat **Schl-32.319** ausgehen oder über die weniger komplexe Boc-geschützte Vorstufe **253** erfolgen.



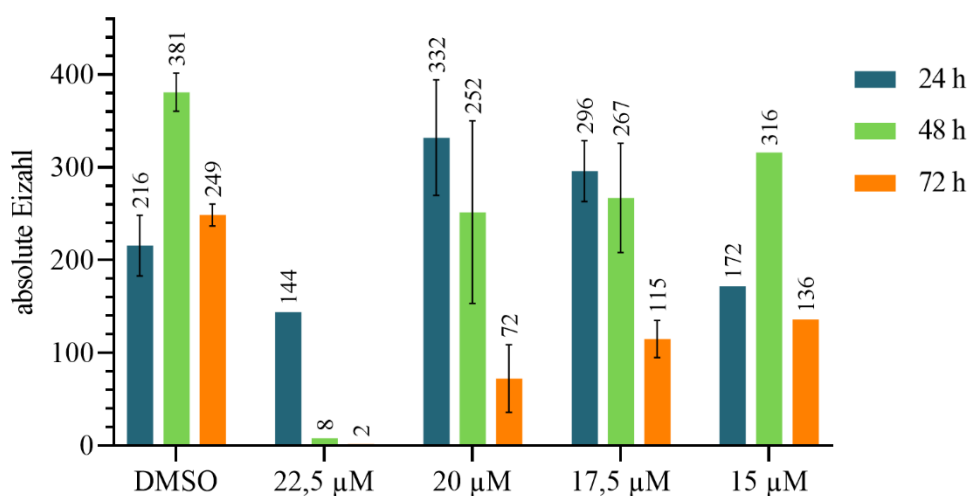
**Abbildung 102:** Das tetra-substituierte Schwefelsäurediamid **Schl-32.361** als Ausgangspunkt für die weitere Strukturoptimierung

Verbindung **Schl-32.361** ist das einzige Schwefelsäurediamid, welches in der Arbeit von P. MÄDER entstand und antischistosomal aktiv war.<sup>[286]</sup> Auch dieses wurde nochmals frisch hergestellt und erneut getestet. Dabei zeigte es ab einer Konzentration von 17,5  $\mu\text{M}$  erste Anzeichen von Wirksamkeit. Innerhalb von 72 h hatte es eine 60%-ige Reduktion der

Paarungsstabilität sowie eine etwa 30%-ige Reduktion der Motilität zur Folge (**Abb. 103**). Ferner traten innerhalb von 48 h starke Darmdilataionen an den Weibchen auf. Die Eiproduktion wurde nicht signifikant inhibiert (**Abb. 104**). Sowohl die Paarungsstabilität als auch die Eiproduktion wurden erst ab einer Konzentration von 22,5  $\mu\text{M}$  vollständig gestört. Die Motilität nahm mit zunehmender Konzentration ab und erreichte bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 22,5  $\mu\text{M}$  Werte von etwa 45% oder aber 65% Inhibition. Ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  wurden die starken Darmdilataionen zudem von schwachen Tegumentschäden begleitet. Diese nahmen an Intensität zu und waren dann ab 25  $\mu\text{M}$  stark ausgeprägt.



**Abbildung 103:** WMS des *N,N*-Dimethylsulfamoylpiperazinamids **Schl-32.361** bei verschiedenen Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden

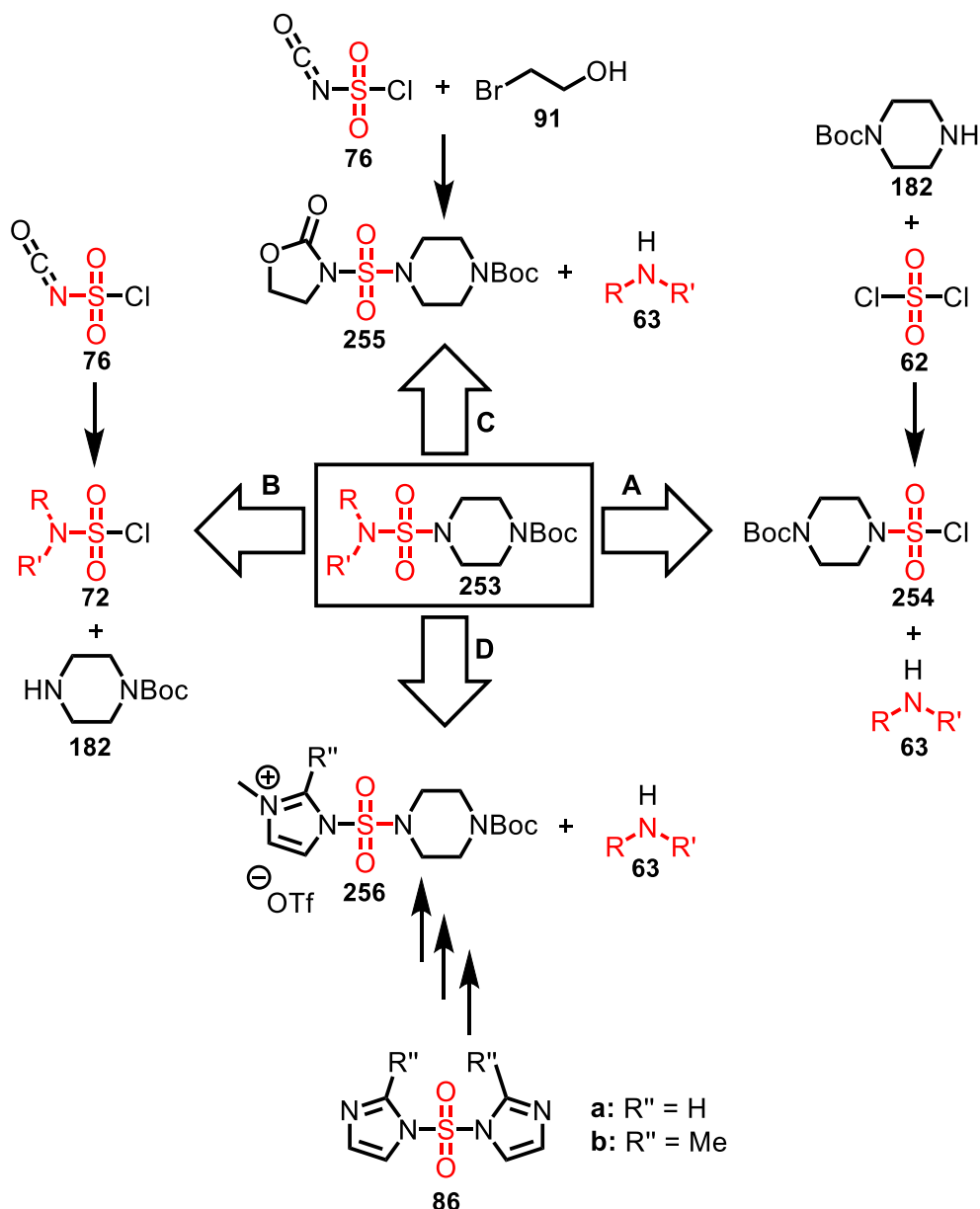


**Abbildung 104:** Absolute Eizahlen des *N,N*-Dimethylsulfamoylpiperazinamids **Schl-32.361** bei verschiedenen Konzentrationen nach 24, 48 und 72 Stunden

Ein Vergleich mit der Arbeit von P. MÄDER offenbart wiederum eine Diskrepanz der Testergebnisse.<sup>[286]</sup> Während zuvor eine Wirksamkeit von **Schl-32.361** bis zu 5  $\mu\text{M}$  in Form von

Darmdilatationen und Entpaarungen beobachtet wurde, ließ sich dies in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Stattdessen offenbarten die aktuellen Ergebnisse, dass die Substanz bereits ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  gänzlich unwirksam ist. Die Abweichung lässt sich mit einem Faktor von etwa 3,5 beziffern. Eine plausible Erklärung ist auch hier nicht möglich.

Zur Synthese der Boc-geschützten Vorstufe sollten die in der Einleitung erwähnten Synthesemethoden genutzt werden, die in **Abbildung 105** nochmals aufgeführt sind.



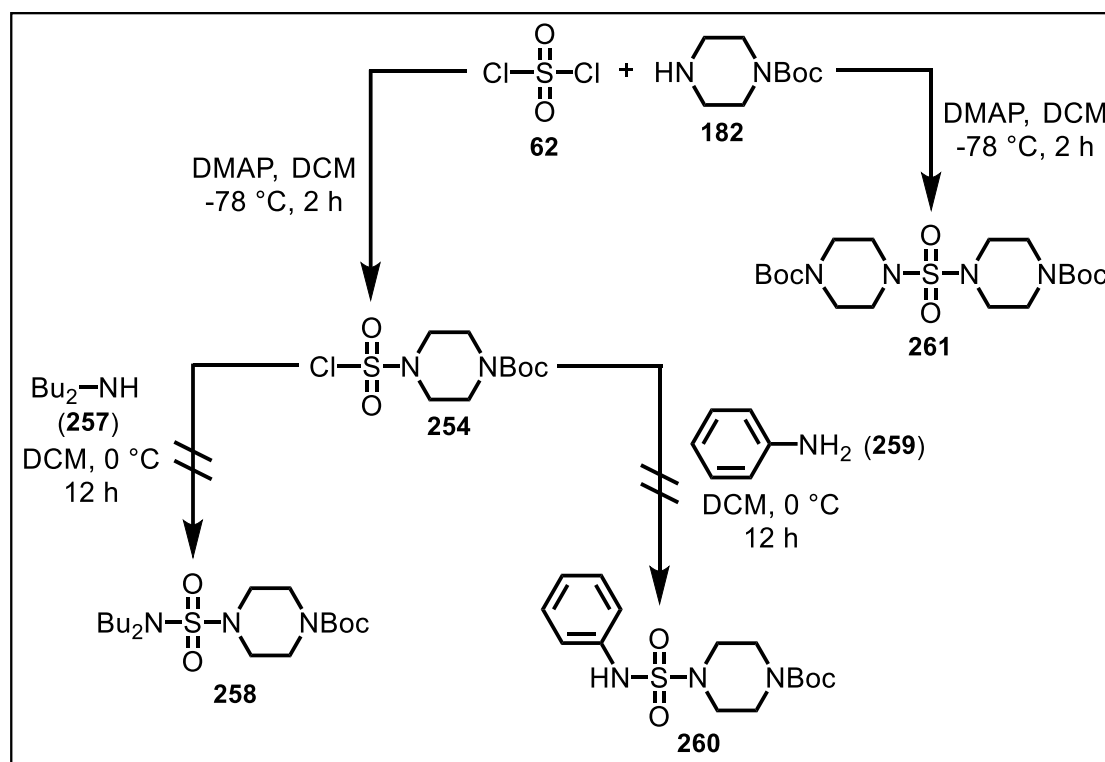
**Abbildung 105:** Retrosynthetische Überlegung zur Darstellung der Boc-geschützten Vorstufe 249

Begonnen werden sollte mit der Synthese der Sulfamide 253 durch Reaktion von Sulfamoylchlorid 254 mit den entsprechenden Dialkylaminen 63 (Abb. 105, A). Das Sulfamoylchlorid 254 wiederum sollte aus Sulfurylchlorid 62 und Boc-Piperazin (182) dargestellt werden. Durch Variation der Reaktionstemperatur und dem Verhältnis von

Sulfurylchlorid zu Dialkylamin sollten geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, um eine zweifache Reaktion desamins mit dem starken Elektrophil Sulfurylchlorid zu vermeiden und somit selektiv nur die mono-aminieren Verbindungen zu erhalten. Weiterhin galt es für die Synthese des unsubstituierten Sulfamoylchlorids, die Reaktion von Isocyanat **76** mit Ameisensäure zu nutzen (**Abb. 105, B**). Jener Ansatz bietet auch die Möglichkeit der Darstellung eines tertiär substituierten Sulfamids durch Reaktion des Isocyanats mit *tert*-Butanol und darauffolgender Deprotonierung und Alkylierung des *N*-Sulfamoyl-Carbamats. Ein anderer Zugang zu der Boc-geschützten Vorstufe **253** bieten Substitutionsreaktionen mit verschiedenen Aminen (**63**) an *N*-Sulfamoyloxazolidinon **255** oder den Sulfonylimidazoliumsalzen **86a+b** (**Abb. 105, C+D**). Während im ersten Fall das Oxazolidinon als Abgangsgruppe fungiert, ist im letztgenannten Fall die zuvor methylierte und damit positiv geladene Imidazoliumgruppe als Abgangsgruppe aktiv.

### Synthesevariante A

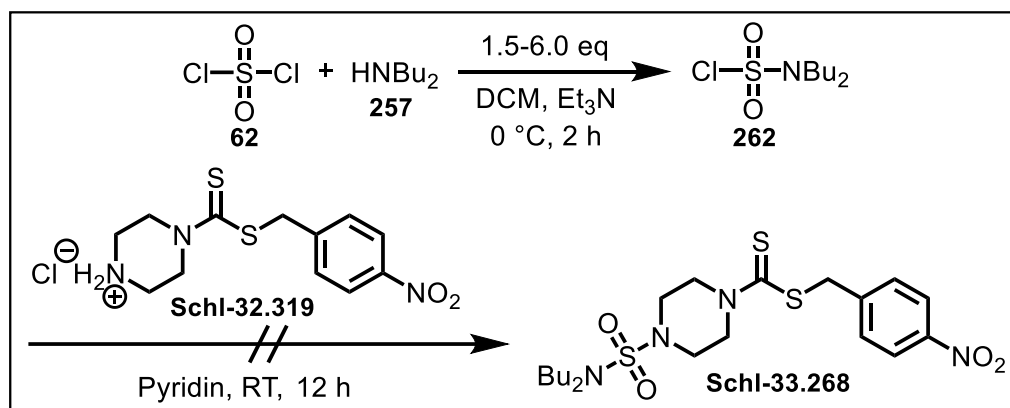
Angelehnt an eine Methode von CHERFAOUI *et al.* und AOKI *et al.* wurde zunächst versucht, das Schwefelsäurediamid über das Sulfamoylchlorid **254** dazustellen.<sup>[509–511]</sup> **254** sollte dazu ausgehend von einem Äquivalent Sulfurylchlorid (**62**), Boc-Piperazin (**182**) und 4-(Dimethylamino)pyridin als Hilfsnucleophil bei tiefen Temperaturen von -78 °C erhalten werden (**Schema 44**).



**Schema 44:** Vermeintliche Synthese des Sulfamoylchlorids **254** aus Sulfurylchlorid und Boc-Piperazin sowie Bildung des symmetrischen, tetra-substituierten Sulfamids **261**

Das Sulfurylchlorid wurde hierzu vorgelegt und tropfenweise mit dem in Dichlormethan gelösten Boc-Piperazin versetzt. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte nach der in der Literatur angegebenen Reaktionszeit eine Reaktion von Sulfurylchlorid mit Boc-Piperazin festgestellt werden. Die Reaktion von Sulfamoylchlorid **254** mit den Stickstoffnucleophilen Dibutylamin (**257**) und Anilin (**259**) blieb jedoch aus, es bildete sich vielmehr das symmetrische Sulfamid **261**, das massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.

Um eine mehrfache Umsetzung des Sulfurylchlorids mit dem Amin im Weiteren zu vermeiden, wurde Sulfurylchlorid (**62**) in einem Überschuss von 1,5 eq bis 6,0 eq vorgelegt und mit Dibutylamin (**257**), das tropfenweise und stark verdünnt in Dichlormethan dazugegeben wurde, zur Reaktion gebracht (**Schema 45**). Das überschüssige Sulfurylchlorid wurde destillativ entfernt und das Produkt **262** ohne weitere Reinigung mit Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** in Pyridin umgesetzt.

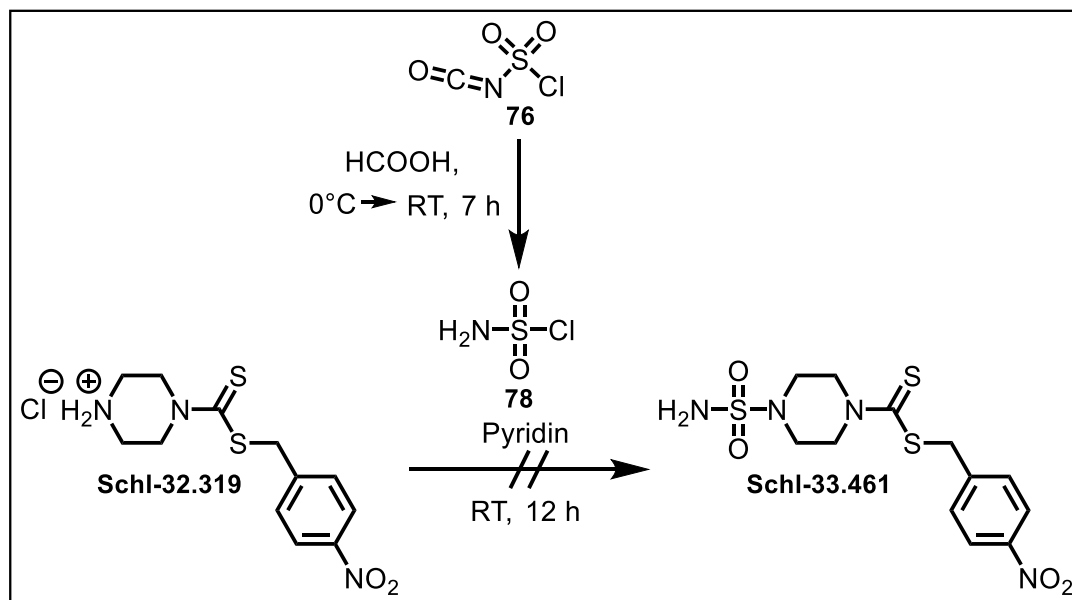


**Schema 45:** Vermeintliche Synthese des *N,N*-Dibutylsulfamoylchlorids **262** unter verschiedenen Sulfurylchlorid/Amin-Verhältnissen und fehlgeschlagene Synthese nach dessen Umsetzung zum Dithiocarbamat **Schl-33.268**

Auch bei dieser Reaktion konnte kein Umsatz von Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** dünnschichtchromatographisch beobachtet werden. Dies legt wiederum die Vermutung nahe, dass selbst bei einem deutlichen Überschuss von 6 Äquivalenten an Sulfurylchlorid (**76**) zu Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** nicht das gewünschte Sulfamoylchlorid **Schl-33.268** sondern vermutlich das entsprechend symmetrische Schwefelsäurediamid entstand. Nach zahlreichen weiteren Versuchen der Synthese der Sulfamide ausgehend von Sulfurylchlorid, zu denen auch das Erhitzen eines etwaigenamins in einem Überschuss aus Sulfurylchlorid gehörte (angelehnt an eine Methode von WEIB *et al.*), wurde von jener Methode schließlich Abstand genommen.<sup>[360]</sup>

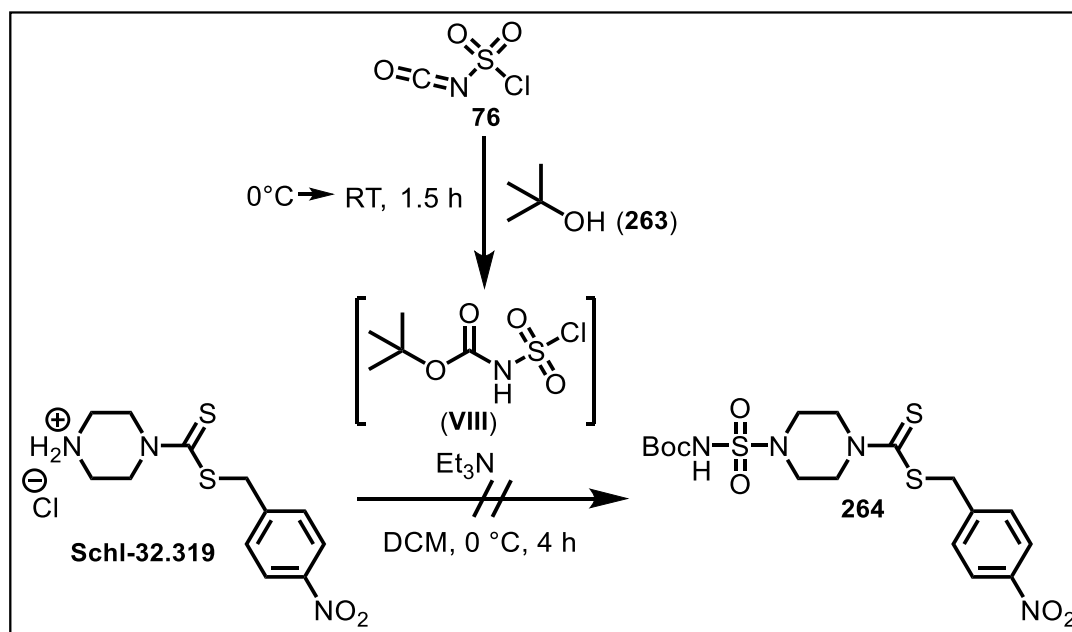
### Synthesevariante B

Stattdessen wurde versucht, das sekundär substituierte Sulfamid nach einer Methode von TIMBERLAKE *et al.* zu synthetisieren.<sup>[364]</sup> Hierbei sollte Chlorsulfonylisocyanat (**76**) zunächst durch Reaktion mit Ameisensäure in Sulfamoylchlorid **78** übergehen, das daraufhin direkt mit Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** das Schwefelsäurediamid **Schl-33.461** ergibt (**Schema 46**). Allerdings konnte unter den gegebenen Reaktionsbedingungen das gewünschte Produkt **Schl-33.461** spektroskopisch nicht nachgewiesen werden.



**Schema 46:** Fehlgeschlagene Synthese des di-substituierten Sulfamids **Schl-33.461** aus Chlorsulfonylisocyanat durch Decarboxylierung und Decarbonylierung mit Ameisensäure

Im Weiteren wurde auf eine Methode von DEMARCO *et al.* und BOUFAS *et al.* zurückgegriffen (**Schema 47**).<sup>[376,512]</sup> Chlorsulfonylisocyanat (**76**) wurde dabei mit *tert*-Butanol (**263**) in das instabile Boc-geschützte Sulfamoylchlorid **VIII** überführt, das schließlich mit dem Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** zum *N*-Sulfamoyl-Carbamat **264** abreagieren sollte. Säurekatalysierte Abspaltung der Schutzgruppe hätte dann das di-substituierte Sulfamid ergeben sollen. In einer abgewandelten Variante wurde das Sulfamoylchlorid **VIII** zunächst mit DMAP umgesetzt und ein *Burgess*-artiges Reagenz erzeugt, dass dann im Folgenden mit dem Amin zur Reaktion gebracht wurde.<sup>[374]</sup> Auch bei diesen Reaktionen konnte mittels NMR-Spektroskopie nicht das gewünschte Produkt **264** nachgewiesen werden, so dass dieser Syntheseansatz ebenfalls nicht weiterverfolgt wurde.

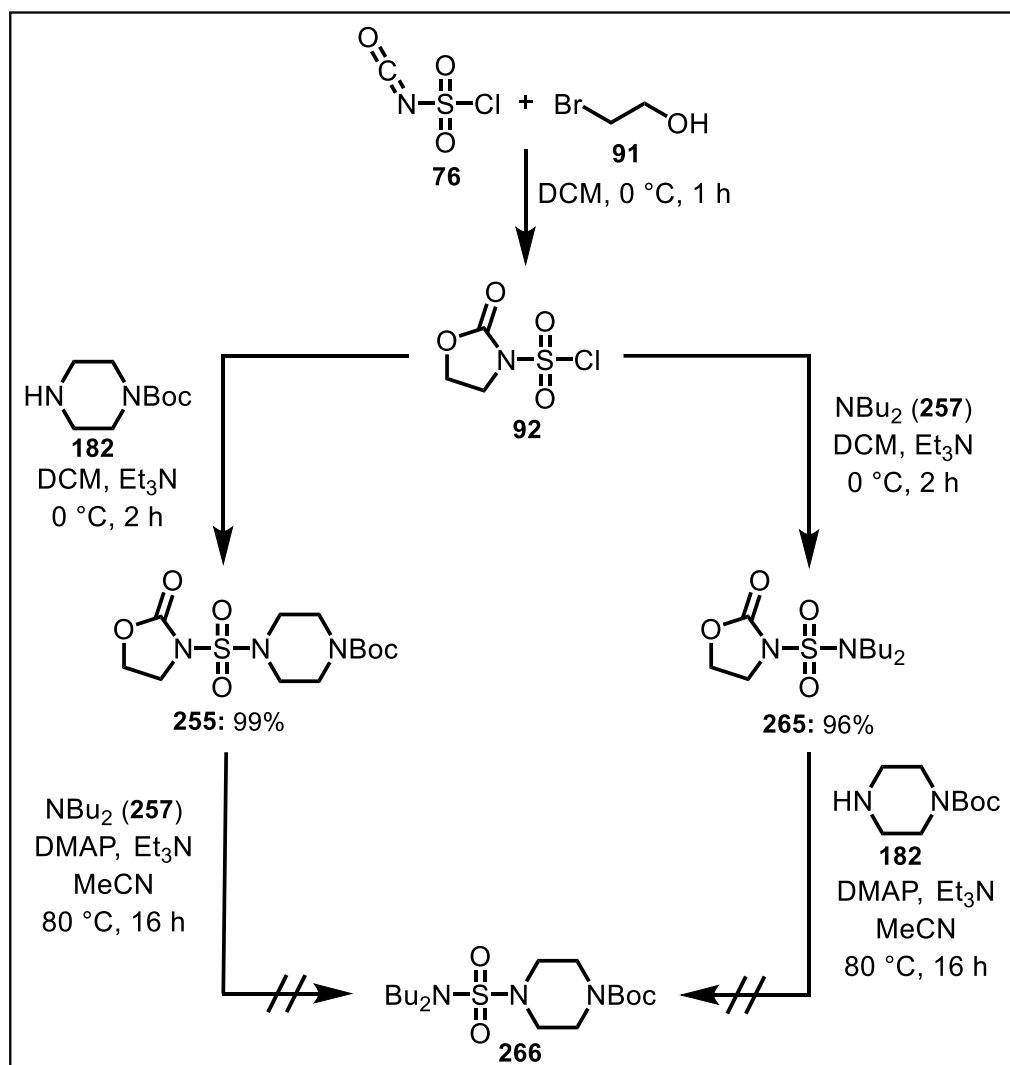


**Schema 47:** Fehlgeschlagene Synthese des Boc-geschützten Sulfamids **264** aus Chlorsulfonylisocyanat und *tert*-Butanol

### Synthesevariante C

Als dritte Methode zur Synthese der Sulfamide wurde die über die *N*-Sulfamoyloxazolidinone gewählt (**Schema 48**).<sup>[513–516]</sup> Chlorsulfonylisocyanat (**76**) wurde hierzu zunächst tropfenweise mit 2-Bromethanol (**91**) versetzt. Das daraufhin gebildete Chlorsulfonyloxazolidinon (**92**) wurde anschließend mit Boc-Piperazin (**182**) oder Dibutylamin (**257**) als Nucleophil in die entsprechenden 2-Oxo-Oxazolidine **255** und **265** überführt. Diese konnten in sehr guten Ausbeuten (>95%) erhalten werden. Die Umsetzung der 2-Oxo-Oxazolidine **255** und **265** mit den Nucleophilen Dibutylamin (**257**) beziehungsweise Boc-Piperazin (**182**) zur Synthese des unsymmetrischen Schwefelsäurediamids **266** konnte dünnschichtchromatographisch jedoch nicht beobachtet werden. Vermutlich verläuft die Reaktion über eine *N*-Sulfonylamin-Spezies ( $\text{RN}=\text{SO}_2$ ) und ist daher nur für primäre Amine geeignet.<sup>[382]</sup>

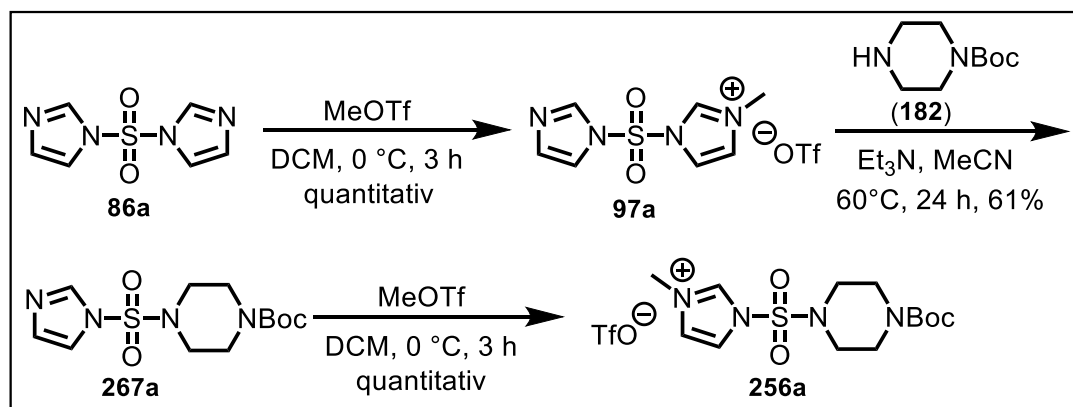




**Schema 48:** Erfolgreiche Synthese der 2-Oxo-Oxazolidine **255** und **265** ausgehend von Chlorsulfonylisocyanat und 2-Bromethanol und fehlgeschlagene Synthese des unsymmetrischen Schwefelsäurediamids **266**

### Synthesevariante D

Als letzte Möglichkeit der Darstellung von Sulfamiden wurde die nucleophile Substitution an Imidazoliumsalzen ins Auge gefasst (**Schema 49**).<sup>[385]</sup>

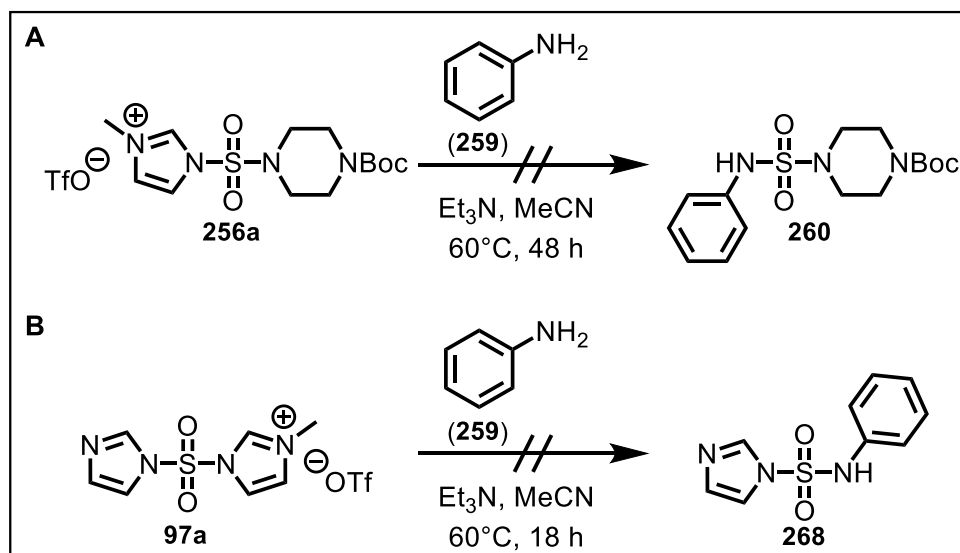


**Schema 49:** Erfolgreiche Synthese des Imidazoliumsalzes **252a** ausgehend von 1,1'-Sulfonyldiimidazol

*N,N'*-Sulfurylbisimidazol (**86a**) wurde dazu mit Methyltriflat im ersten Schritt der Reaktionssequenz zunächst mono-alkyliert (**97a**) und dann mit Boc-Piperazin (**182**) zur Reaktion gebracht. Nach weiterer Methylierung konnte das Imidazoliumsalz **256a** in einer akzeptablen Gesamtausbeute von 61% isoliert werden.

**256a** wurde darauffolgend mit verschiedenen Stickstoffnucleophilen umgesetzt, um so die Vorstufen der Zielverbindungen mit Schwefelsäurediamid-Gerüst zu erhalten. Anilin (**259**) wurde dabei eingangs als Nucleophil gewählt, da für dieses in der Literatur sehr gute Ausbeuten beschrieben werden.<sup>[385]</sup> Die Ergebnisse konnten unter identischen Reaktionsbedingungen jedoch nicht reproduziert werden. Auch nach längeren Reaktionszeiten konnte mittels Dünnschichtchromatographie keine Reaktion des Imidazoliumsalzes **256a** mit dem Anilin (**259**) festgestellt werden (Schema 50, A).

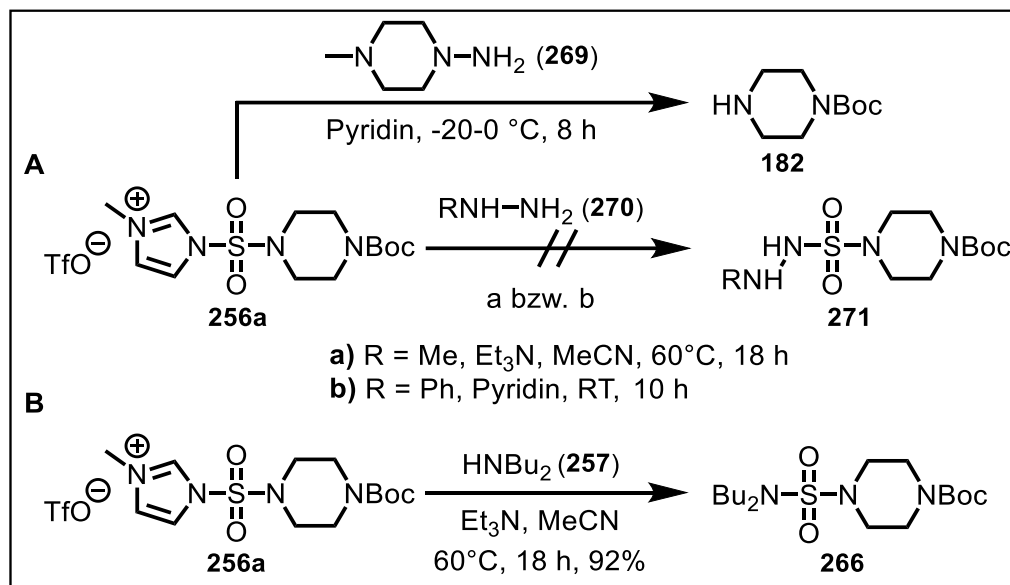
Um mögliche sterische Effekte für das Versagen der Reaktion auszuschließen, wurde Anilin (**259**) gleichfalls mit dem sterisch weniger anspruchsvollen Imidazoliumsalz **97a** umgesetzt. Damit wurde die Reaktionssequenz in ihrer Reihenfolge umgedreht; das Boc-Piperazin wäre in diesem Fall erst als zweites Nucleophil gefolgt. Aber auch bei diesem Ansatz konnte mittels Dünnschichtchromatographie keinerlei Reaktionsumsatz festgestellt werden (Schema 50, B).



**Schema 50:** Fehlgeschlagene Synthese des Sulfamids **256** aus Anilin ausgehend von den Imidazoliumsalzen **256a** und **97a**

Schließlich wurde das Imidazoliumsalz **256a** mit den stärkeren Nucleophilen, dem 1,1-Dimethylhydrazin (**270a**) und Dibutylamin (**257**) umgesetzt (Schema 51). Die erhöhte Nucleophilie des Hydrazins ist dabei durch den  $\alpha$ -Effekt zu erklären, also die Präsenz des benachbarten freien Elektronenpaares des zweiten Stickstoffatoms. Die parallele Anordnung zweier besetzter p-Orbitale führt dabei zu einem energetisch hochliegenden HOMO (höchstes

besetztes Molekülorbital). Während bei der Umsetzung mit 1,1-Dimethylhydrazin das Produkt **267** nicht entstand, wurde mit Dibutylamin das gewünschte Produkt **266** in einer sehr guten Ausbeute von 92% erhalten. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass die Umsetzung auch mit anderen Hydrazinen wie etwa Phenylhydrazin (**270b**) oder 4-Methyl-piperazin-1-amin (**269**) in Pyridin selbst bei Temperaturen von 0 °C nicht erfolgreich war und gar zur Substitution des zuvor eingeführten Boc-Piperazins (**182**) führte. Damit verbunden wäre vermutlich auch die Bildung des entsprechend symmetrischen Schwefelsäuredihydrazids, das jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Es wäre denkbar, dass das niedrige Reduktionspotenzial von Hydrazin im Basischen zur Zersetzung des Hydrazin-Derivats zu N<sub>2</sub> führte.<sup>[517]</sup> Neben der Abspaltung von Boc-Piperazin könnte es im Weiteren auch zur gleichzeitigen Bildung von Schwefeldioxid und damit zur Zersetzung des zwischenzeitlich gebildeten Reaktionsproduktes gekommen sein. Ein Sulfamoylradikal als reaktives Intermediat oder ein an der *Wolff-Kishner*-Reaktion angelehnter Mechanismus wären möglich.<sup>[518]</sup> Sulfonylradikale werden in der Literatur beschrieben und können aus Sulfonylhydrazinen entstehen, was auch die Existenz von Sulfamoylradikalen wahrscheinlich macht.<sup>[519]</sup> Die Beobachtungen bei den Reaktionen mit den Hydrazinen, die eine geringe Stabilität der (Hydrazinsulfonyl)amin-Derivate vermuten lassen, deckt sich mit den nur spärlich vorhandenen Beschreibungen jener Stoffklasse in der Literatur. Dennoch wäre für Folgearbeiten die Umsetzung mit jedoch einem tri-substituierten Hydrazin ratsam.

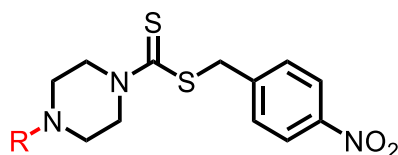


**Schema 51:** Erfolgreiche Synthese der Schwefelsäurediamid-Vorstufe **266** aus Dibutylamin und fehlgeschlagene Synthese des *N*-Sulfamoylhydrazins **271**

### Derivate aus azyklischen Dialkylaminen und Cycloalkylaminen

Das Schwefelsäurediamid **266** aus Dibutylamin war das erste, welches ausgehend von Sulfonylbisimidazol (**86a**) erhalten werden konnte. Weitere Di-*n*-alkylamine, welche neben Dibutylamin umgesetzt wurden, waren Diethylamin, Dipropylamin und Dihexylamin. Ein Dipentylamin-Derivat war auch nach mehreren Versuchen nicht sauber darzustellen. Neben unterschiedlich langen Alkylketten wurden auch unterschiedlich große Ringe wie Pyrrolidin (5-Ring), Piperidin (6-Ring) und Hexamethylenimin (7-Ring) in das Schwefelsäurediamidgerüst eingebunden, deren *Pitzer*-Spannung (konformative Spannung) mit Ausnahme des 6-Rings aber vergleichbar ist.

**Tabelle 18:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivaten aus azyklischen Dialkylaminen und Cycloalkylaminen (\*Ausbeute über eine Stufe berechnet)

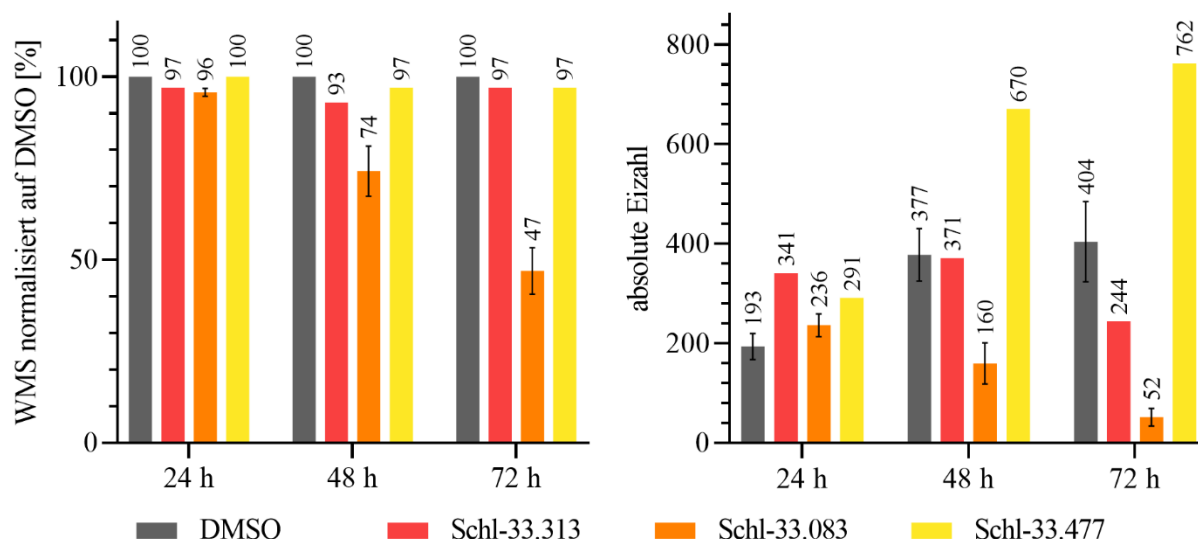


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
	50		9
	29		61*
	47		32
	54		

Das Cyclohexylamin-Derivat war das einzige, dessen Darstellung über die konventionelle Syntheseroute mit den Sulfamoylchloriden gelang. Die Schwefelsäurediamide aus azyklischen

Dialkylaminen und zyklischen Alkylaminen wurden in mittleren, bis guten Ausbeuten von 45-85% erhalten und im Anschluss Boc-entschützt und mit Kohlenstoffdisulfid in die entsprechenden Dithiocarbamate überführt. Dabei machte insbesondere das Pyrrolidin-Derivat **Schl-33.313** leichte Probleme, das lediglich mit einer Gesamtausbeute von 9% dargestellt werden konnte (**Tab. 18**).

Die *in-vitro*-Testung der unterschiedlich langen Dialkylschwefelsäurediamide zeigte, dass diese bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  inaktiv waren. Von den verschiedenen großen Ringsystemen besaß nur das Piperidin-Derivat **Schl-33.083** eine antischistosomale Aktivität. Dies äußerte sich in einer 70%-igen Reduktion der Paarungsstabilität, einer etwa 50%-igen Reduktion der Motilität sowie einer gegenüber der DMSO-Kontrolle etwa um 85% reduzierten Eizahl (**Abb. 106**). Die Wirkung schwankte mitunter sehr stark, sodass in einzelnen Testungen auch letale Effekte auftraten. Über die Gesamtheit von acht Testungen konnten diese Schwankungen jedoch ausgeglichen werden. Es zeigten sich Phänotypen wie starke Darmdilatationen, welche bei den Weibchen beobachtet werden konnten, und weniger starke Tegumentschäden. Ab 5  $\mu\text{M}$  ging die Wirkung des Schwefelsäurediamids verloren.



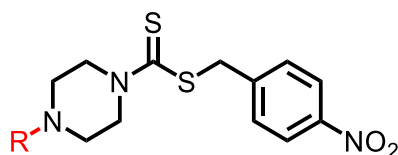
**Abbildung 106:** WMS und absolute Eizahlen von Schwefelsäurediamid-Derivaten aus der zyklischen Dialkylaminen bei 10  $\mu\text{M}$  nach verschiedenen Zeiten

### Piperidin-analoge Derivate

Im nächsten Schritt wurde der Piperidinyl-Rest von **Schl-33.083** ( $\text{clogP} = 3,21$ ) weiter derivatisiert und z.B. gegen einen stärker polaren Piperidin-4-on- (**Schl-33.539**;  $\text{clogP} = 1,19$ ) und einen Piperidin-4-ol-Rest (**Schl-33.559**;  $\text{clogP} = 1,04$ ) ausgetauscht. Ebenso wurde ein weiteres Heteroatom in den 6-Ring gebracht und ein Morpholin- (**Schl-33.292**;  $\text{clogP} = 0,73$ ), ein Thiomorpholin- (**Schl-33.290**;  $\text{clogP} = 1,14$ ) sowie ein Boc-Piperazinyl-Derivat (**Schl-33.332**;  $\text{clogP} = 2,25$ ) dargestellt durch Reaktion von **256a** mit **Schl-32.319**. Das

Entfernen der *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe ergab **Schl-32.362** (clogP = 0,33). Die Darstellung der Schwefelsäurediamid-Vorstufen verlief auch im Fall der zyklischen Amine mit guten Ausbeuten, während die Reaktion der Hydrochloride mit CS<sub>2</sub> und dem 4-Nitrobenzylbromid mitunter zu einer verminderten Gesamtausbeute führten (**Tab. 19**).

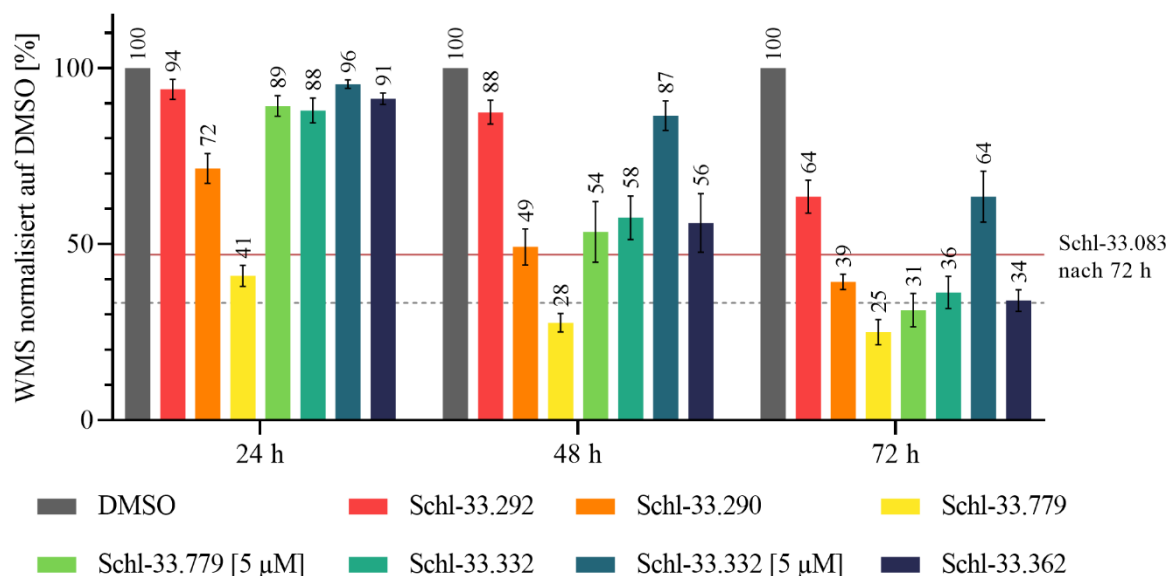
**Tabelle 19:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivaten zur Optimierung des Piperidiny-Derivats **Schl-33.083** (\*Ausbeute über eine Stufe berechnet; \*\*Ausbeute ausgehend vom Diamid berechnet)



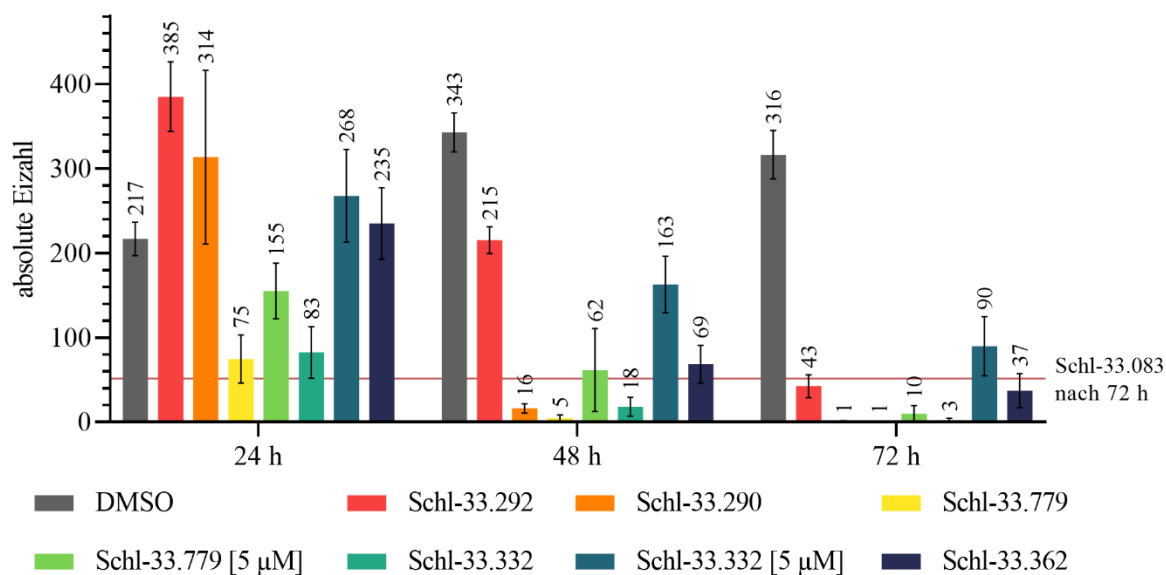
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.539</b>	17**	 <b>Schl-33.290</b>	26**
 <b>Schl-33.559</b>	43**	 <b>Schl-33.779</b>	73*
 <b>Schl-33.292</b>	40**	 <b>Schl-33.332</b>	38*
 <b>Schl-33.337</b>	19**	 <b>Schl-33.362</b>	86*

**Schl-33.539** und **Schl-33.559** waren antischistosomal unauffällig, während das Morphin-Derivat **Schl-33.292** analog zu dem Piperidiny-Derivat **Schl-33.083** einen Abfall der Eiproduktion bis auf etwa 15% auslöste (**Abb. 108**). Gleichwertig waren auch auftretende Phänotypen zu bewerten. Jedoch war bei **Schl-33.292** ein etwa 20% schwächerer Rückgang bei der Motilität und der Anzahl von Paaren zu beobachten (**Abb. 107**). Um etwa 15% aktiver als **Schl-33.083** hinsichtlich der Inhibition der Produktion von Eiern war das Thiomorpholin-Derivat **Schl-33.290**. Es reduzierte auch die Motilität um etwa 10% stärker und erzwang nach 72 h eine vollständige Entpaarung aller Schistosomen. Unterhalb von 10 µM zeigte es noch vereinzelt schwache Darmdilatationen. Das trifft auch auf das Boc-Piperaziny-Derivat

**Schl-33.332** zu, das die Motilität bei 5  $\mu\text{M}$  immerhin noch um etwa 35% hemmte und weiterhin 50% der Paare voneinander löste sowie 80% weniger Eier verursachte. **Schl-33.362** war im Unterschied dazu nur bis 10  $\mu\text{M}$  aktiv, führte aber nicht nur bei den Männchen zu starken bis sehr starken Darmdilatationen. Ebenso war es für die annähernd vollständige Entpaarung der Schistosomen, den Rückgang der Eiproduktion um etwa 90% und die Reduktion der Motilität um zwei Drittel gegenüber der Norm verantwortlich.



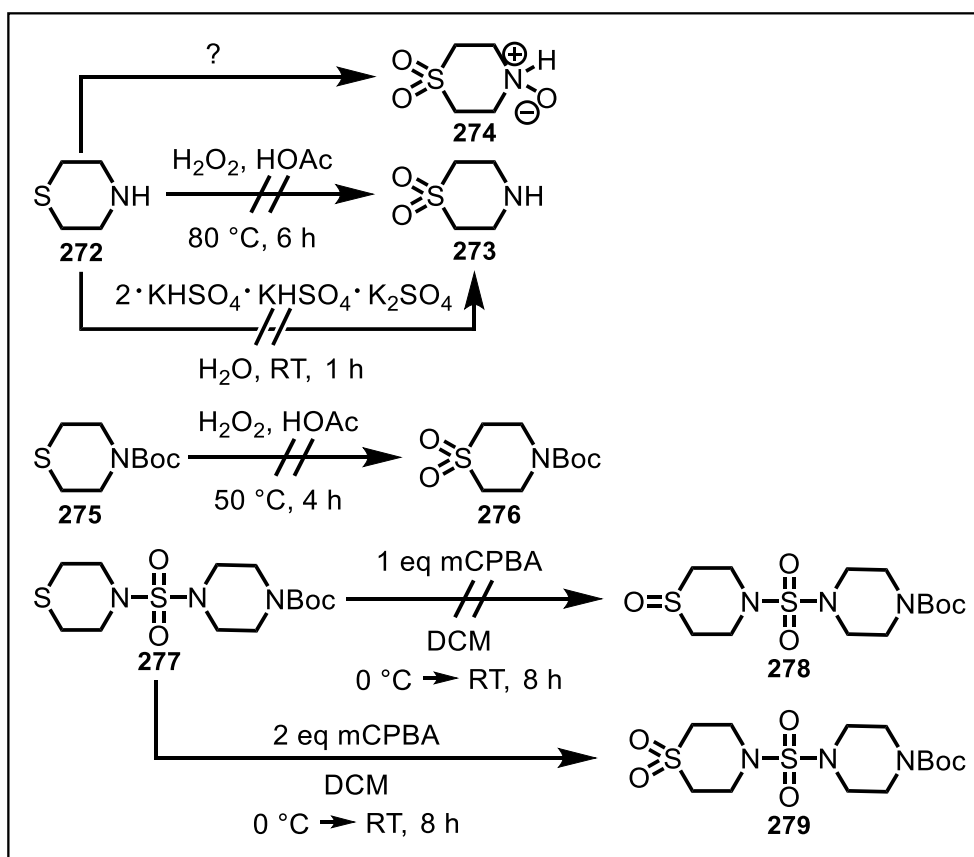
**Abbildung 107:** WMS der Schwefelsäurediamid-Derivate zur Optimierung des Piperidinylderivats **Schl-33.083** bei 10  $\mu\text{M}$  (und 5  $\mu\text{M}$ ) nach verschiedenen Zeiten



**Abbildung 108:** Absolute Eizahlen der Schwefelsäurediamid-Derivate zur Optimierung des Piperidinylderivats **Schl-33.083** bei 10  $\mu\text{M}$  (und 5  $\mu\text{M}$ ) nach verschiedenen Zeiten

Die Optimierung des Thiomorpholin-Derivats **Schl-33.290** sah die Bildung eines Schwefelsäurediamids aus Thiazolidin und damit eine Ringverengung sowie die Bildung der Oxidationsprodukte vor. Nach einer Vorschrift von LAZER *et al.* wurde Thiomorpholin (**272**)

hierzu mit Wasserstoffperoxid in Essigsäure erhitzt (**Schema 52**).<sup>[520]</sup> Das Thiomorpholin-Dioxid **273** konnte jedoch nicht isoliert werden, was möglicherweise an der gleichzeitigen Bildung des Amin-*N*-oxids **274** lag. Auch eine Synthesemethode nach ZHENG *et al.*, wonach Thiomorpholin (**272**) in einer wässrigen Lösung mit Kaliumperoxymonosulfat als Oxidationsmittel umgesetzt wurde, scheiterte.<sup>[521]</sup> Deshalb wurde das Thiomorpholin im Weiteren zunächst Boc-geschützt (**275**) und nach einer Vorschrift von WU *et al.* wiederum mit Wasserstoffperoxid oxidiert (**276**), jedoch ohne merklichen Erfolg.<sup>[522]</sup> Schließlich wurde das Thiomorpholin erst zum Schwefelsäurediamid **277** umgesetzt und daraufhin zu **279** oxidiert, was mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) gelang. Die entstehende *meta*-Chlorbenzoesäure, die unlöslich in Dichlormethan ist, fiel aus der Reaktionslösung aus und konnte somit einfach abgetrennt werden. Die gezielte Darstellung des chiralen Sulfoxids **278** und damit des mono-Oxidationsproduktes konnte bei Verwendung von nur einem Äquivalent mCPBA jedoch selbst nach mehreren Syntheseversuchen nicht erreicht werden.

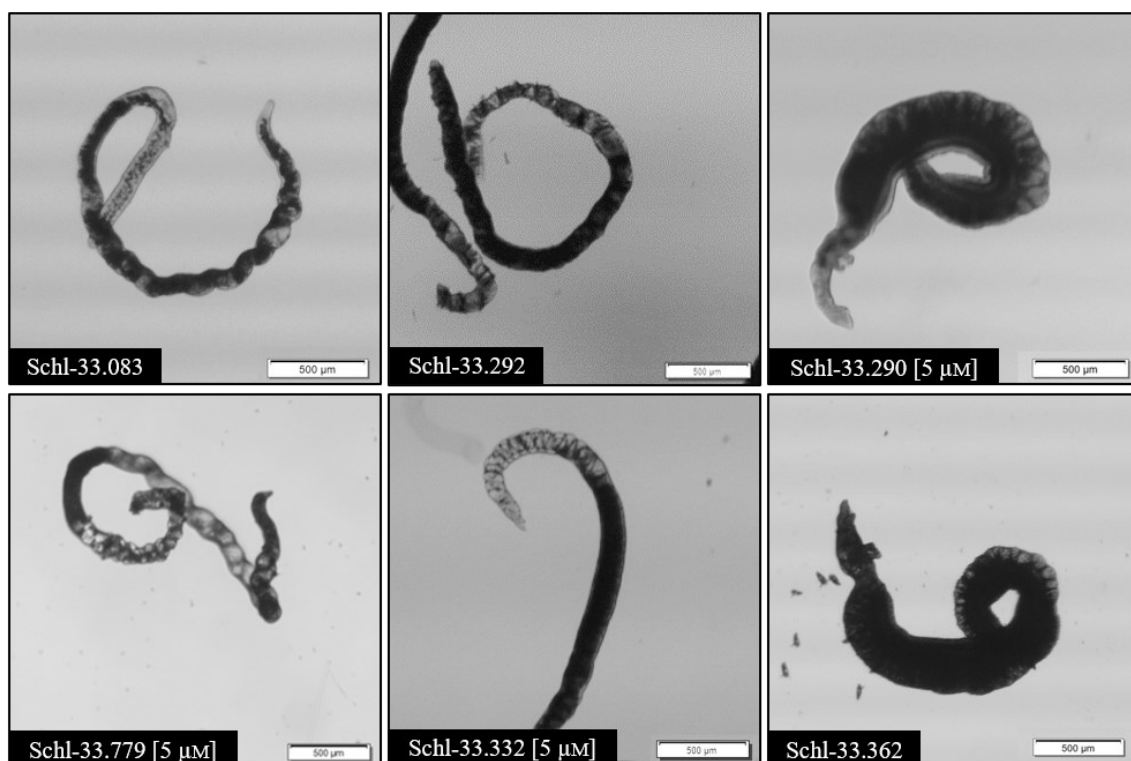


**Schema 52:** Syntheseversuche zur Oxidation des Schwefelatoms im Thiomorpholin

Ermutigt von der guten Wirksamkeit des Boc-Piperazin-Derivats **Schl-33.332**, wurde zudem versucht ein 1,4-Diazacycloheptan-Derivat (Homopiperazin) darzustellen und damit eine Ringerweiterung durchzuführen, was allerdings trotz des Umkehrens der Reihenfolge der Nucleophile letztlich nicht gelang.



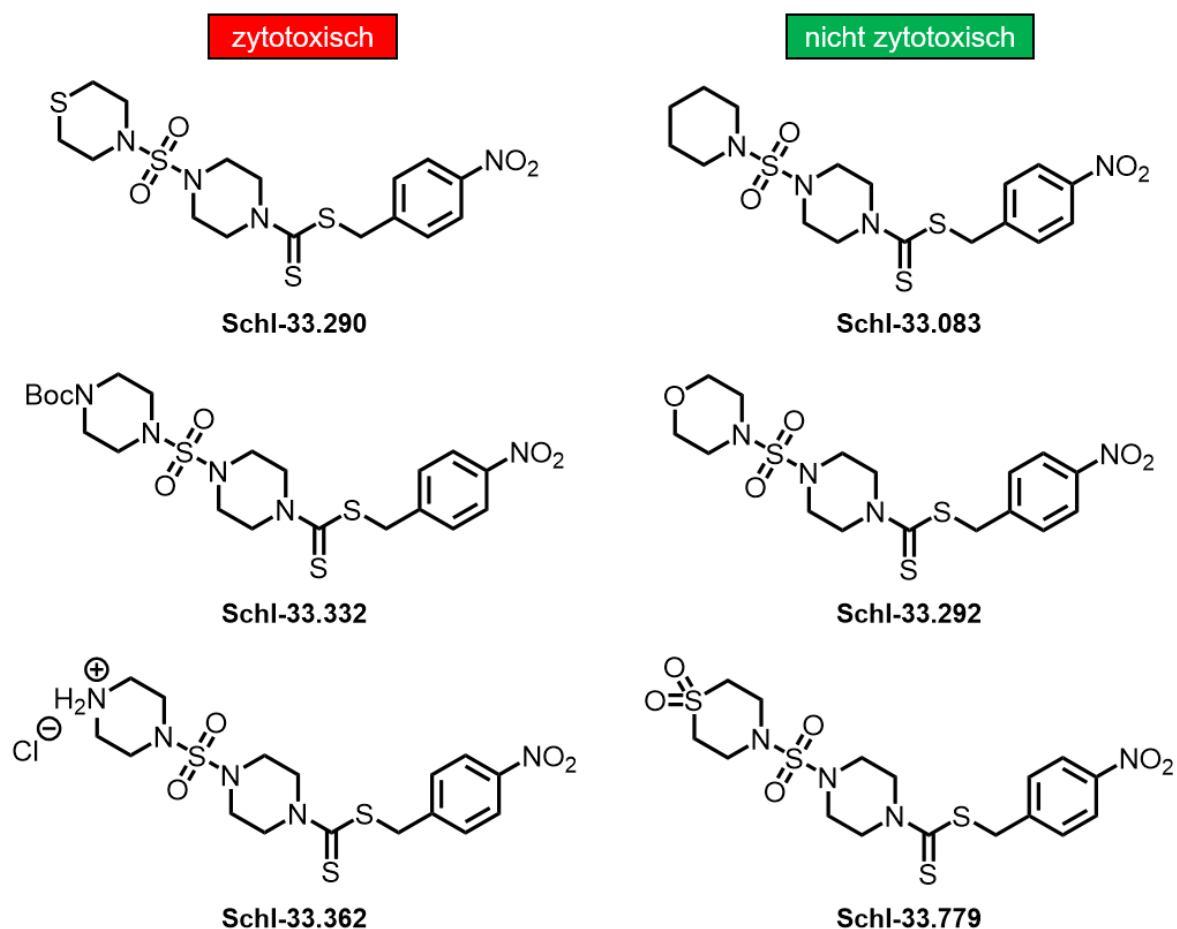
Gegenüber den Schistosomen war das Thiazolidin-Derivat **Schl-33.337** unwirksam. Das Thiomorpholin-Dioxid **Schl-33.779** jedoch reduzierte die Paarungsstabilität bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  innerhalb der ersten 24 h bereits um 50% und nahm auch mit einer etwa 30%-igen Reduktion Einfluss auf die Motilität (**Abb. 107**). Weiterhin kam es zur Ausbildung von massiven Tegumentschäden und schweren Darmdilatationen (**Abb. 109**). Nach 72 h waren alle Schistosomen entpaart und die Eiproduktion wurde vollständig gehemmt (**Abb. 108**). Zudem kam es mit einer Restmotilität von etwa 25% zu deutlichen letalen Effekten. Wurde die Konzentration auf 5  $\mu\text{M}$  reduziert, traten alle Effekte zeitverzögert erst nach 48 h auf. Dennoch entpaarten sich über 72 h weiterhin alle 10 Paare und es wurden letztlich nur noch etwa 10 Eier pro 24 h gelegt. Auch die Motilität blieb schwach unter 33%, sodass **Schl-33.779** selbst bei 5  $\mu\text{M}$  noch letal war. Die Intensität der auftretenden Phänotypen ging lediglich bei den Tegumentschäden etwas zurück, war jedoch immer noch stark. Unterhalb von 5  $\mu\text{M}$  wurde die Eiproduktion über 72 h nicht mehr inhibiert. Die Motilität indessen ging bis 4  $\mu\text{M}$  um etwa 20% zurück. Bis 3  $\mu\text{M}$  traten schwach ausgebildete Darmdilatationen auf und es kam vereinzelt zur Entpaarung.



**Abbildung 109:** Exemplarische Phänotypen der Schwefelsäurediamid-Derivate aus nicht-aromatischen Cycloaminen bei 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h; **Schl-33.083/779/332:** korkenzieherartige/hakenförmige Weibchen mit teils schweren Darmdilatationen und Strukturverlust, **Schl-33.292** zusätzlich mit nadelförmiger Tegumentveränderung; **Schl-33.290/362:** Männchen mit schweren Darmdilatationen, ödematös aufgequollen

Lediglich das Morpholin- (**Schl-33.292**) und das Thiomorpholin-Dioxid-Derivat **Schl-33.779** waren bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie unauffällig (**Abb. 110**). Das Piperidin-

Derivat **Schl-33.083** war bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie nicht zytotoxisch. Sowohl das Thiomorpholin-Derivat **Schl-33.290** als auch das Boc-geschützte Piperazin-Derivat **Schl-33.332** und das Piperazin-Hydrochlorid **Schl-33.362** waren hingegen bereits bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zytotoxisch.



**Abbildung 110:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.290/332/362/083** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.292/779** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie

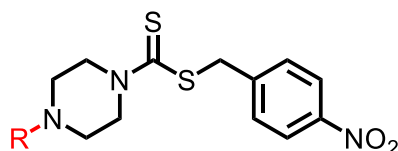
Während die Derivatisierung in der 4-Position des Cyclohexylamins zwar zu keiner Aktivitätssteigerung gegenüber dem Piperidin-Derivat **Schl-33.083** und damit nur einer Verbesserung des Toxizitätsprofils geführt hatte, nahm die Oxidation am Schwefelatom des Thiomorpholins von **Schl-33.290** mit einem Faktor von etwa 4 nicht nur deutlichen Einfluss auf die Zytotoxizität, sondern senkte zugleich auch die effektiv wirksame Konzentration um einen Faktor von 2.

### Derivate aus aromatischen Aminen

Die Reaktion des Imidazoliumsalzes **256a** erfolgte nicht nur mit aliphatischen Aminen, sondern auch mit solchen, die ein aromatisches System besitzen (**Tab. 20**). Zu diesen gehören beispielsweise Tetrahydrochinolin beziehungsweise Tetrahydroisochinolin, aber auch Dibenzylamin. Ein Derivat aus Diphenylamin konnte vermutlich aufgrund von sterischen

Hinderungen nicht dargestellt werden. **Schl-33.328** mit einem 1-((1*H*-Imidazol-1-yl)sulfonyl)piperazin-Gerüst war ausgehend von **97a** durch Reaktion mit dem Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** zugänglich und führte im Gegensatz zu den anderen Aminen, die bei der Umsetzung zu den Schwefelsäurediamiden Ausbeuten von 59-91% ergaben, zu einer geringen Ausbeute von nur 29%.

**Tabelle 20:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten aromatischer Schwefelsäurediamid-Derivate (\*Ausbeute über eine Stufe berechnet)



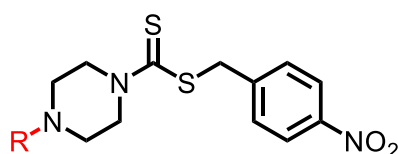
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.550	21	 Schl-33.328	29*
 Schl-33.320	40	 Schl-33.321	24
 Schl-33.562	50		

Unter den Schwefelsäurediamiden mit aromatischer Teilstruktur fanden sich keine, die antischistosomal aktiv waren. Lediglich **Schl-33.328** mit einem Imidazol-Rest war in einer initialen Testung wirksam und Motivation für die Synthese eines Schwefelsäurediamids aus Pyrazol sowie aus 1,2,4-Triazol. Beide Derivate konnten über das Imidazoliumsalz **256a** erfolgreich dargestellt werden; die entsprechenden Dithiocarbamate ließen sich jedoch leider nicht realisieren. Über insgesamt vier Testungen milderte sich zudem die anfängliche Wirksamkeit von **Schl-33.328** ab, sodass abschließend von einer nur scheinbar positiven Wirksamkeit ausgegangen werden kann. Eine Zersetzung des Schwefelsäurediamids durch die Abspaltung des Imidazol-Restes kann an dieser Stelle jedoch eher ausgeschlossen werden.

### Alkylierte und arylierte Piperazin-Derivate

Im Weiteren entstanden Dithiocarbamate mit 1,1'-Sulfonyldipiperazin-Teilgerüst, wobei das endständige Stickstoff-Atom, welches nicht in das Piperazin-Teilgerüst eingebunden war, alkyliert oder aryliert wurde. Schwefelsäurediamid-Derivate mit Ethylpiperazin- (**Schl-33.370**), 1-(2-Hydroxyethyl)piperazin- (**Schl-33.350**) und *N*-Isopropyl-1-piperazin-acetamid-Rest (**Schl-33.374**) wurden erfolgreich dargestellt. Dies trifft auch auf Verbindungen mit einem 1-Phenylpiperazin- (**Schl-33.438**) und einen 1-(4-Methylbenzyl)piperazin-Rest (**Schl-33.406**) zu (**Tab. 21**). Die Darstellung eines *N,N*-Dimethyl-2-(piperazin-1-yl)ethan-1-amin-Derivats scheiterte aufgrund von Problemen bei der Boc-Entschützung, in deren Verlauf nicht nur das Piperazin, sondern auch die endständige Aminogruppe protoniert wurde. Dies erschwerte die Reinigung und Isolierung des gewünschten Reaktionsproduktes.

**Tabelle 21:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivat mit alkyliertem oder aryliertem Piperaziny-Teilgerüst

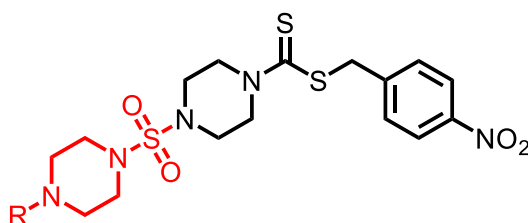



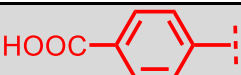

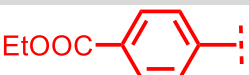
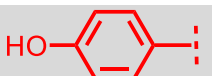
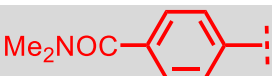
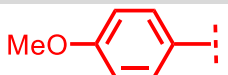
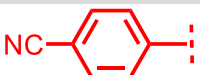
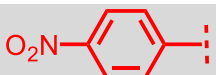
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.370</b>	26	 <b>Schl-33.438</b>	27
 <b>Schl-33.350</b>	34	 <b>Schl-33.406</b>	34
 <b>Schl-33.374</b>	44		

Ausschließlich das Phenylpiperazin-Derivat **Schl-33.438** entfaltete *in vitro* eine Wirkung. Die Verbindung verursachte schwache Darmdilatationen wie auch mittelstarke Tegumentschäden. Nach 72 h war das Bewegungsvermögen der Schistosomen um etwa 60% zurückgegangen und die Anzahl an Eiern lag im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei unter 10% (**Abb. 111**). Nur noch ungepaarte Würmer traten im *well* auf. Erste Anzeichen hinsichtlich einer Wirksamkeit

waren 48 h nach Beginn der Testung wahrzunehmen. Aufgrund der Wirksamkeit des Phenylpiperazin-Derivats wurden weitere Variationen vorgenommen. Dabei wurde der aromatische Ring ausschließlich in *para*-Position substituiert und Reste mit unterschiedlichem elektronischen Effekt eingeführt. Die erhaltenen Strukturvarianten umfassten mit einem Halogenatom substituierte Derivate (**Schl-33.615/472**), Phenol-Derivate (**Schl-33.597/480**), Carbonsäure-Derivate (**Schl-33.759/756/765**), ein Cyano-Derivat (**Schl-33.496**) und ein Nitro-Derivat (**Schl-33.564**) (**Tab. 22**).

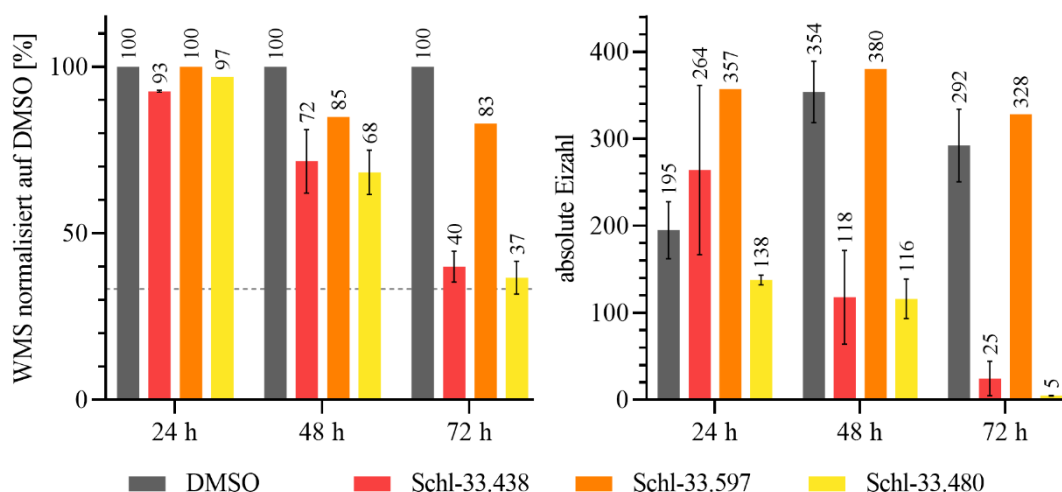
**Tabelle 22:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivaten mit in 4-Position substituiertem Phenylpiperazin-Teilgerüst



R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.615</b>	66	 <b>Schl-33.759</b>	49
 <b>Schl-33.472</b>	23	 <b>Schl-33.756</b>	36
 <b>Schl-33.597</b>	49	 <b>Schl-33.765</b>	49*
 <b>Schl-33.480</b>	37	 <b>Schl-33.496</b>	54
		 <b>Schl-33.564</b>	35

*In vitro* war dann lediglich die Verbindung mit dem +*M*/-*I*-Substituenten -OMe (wobei +*M* > -*I*) bedeutend antischistosomal aktiv. Sie führte bereits innerhalb der ersten 48 h zu einer um etwa 50% reduzierten Entpaarung und 30%-igen Reduktion der Motilität (**Abb. 111**). Nach 72 h waren schließlich alle Wurmpaare entpaart, und die Eiproduktion kam komplett zum

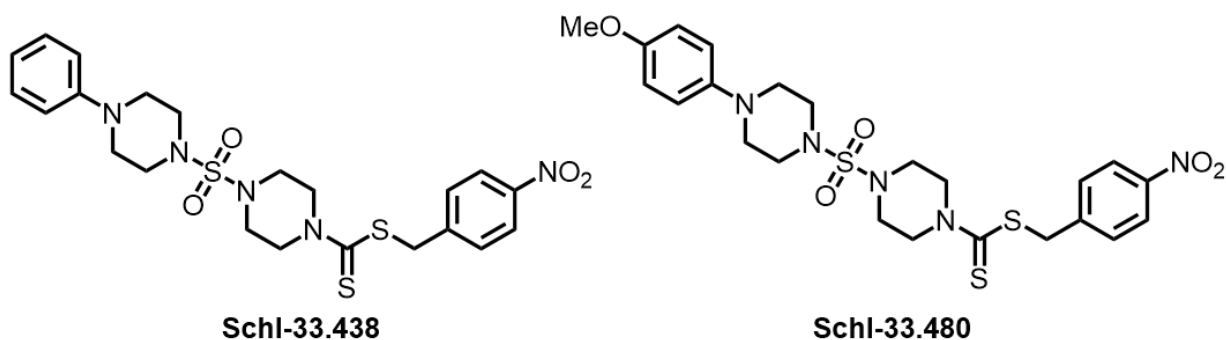
Erliegen. Vereinzelt kam es zudem zu letalen Effekten. Diese wurden jedoch nicht durchweg für jede Testung beobachtet. Neben mittleren bis zum Teil starken Tegumentschäden konnten nach 48 h auch mittlere Darmdilatationen wahrgenommen werden. Hinsichtlich aller Parameter war das Methoxy-Derivat **Schl-33.480** mit dem unsubstituierten Phenylpiperazin **Schl-33.438** zu vergleichen. Alle Effekte waren von etwa gleicher Intensität. Ebenso gab es keinen zeitlichen Unterschied beim Wirkeintritt. Lediglich die Darmdilatationen waren nicht schwacher bis mittlerer Stärke, sondern traten nur vereinzelt und dann schwach auf. Sie waren zudem um 24 h verzögert wahrzunehmen, also erst nach 72 h. Das Phenol-Derivat **Schl-33.597**, das bezüglich der elektronischen Eigenschaften keinen Unterschied aufweist und gleichfalls ein +*M*/-*I*-Substituent ist, war indessen vollständig unwirksam. Der einzige Unterschied ist hier die Fähigkeit, zusätzlich als H-Brückendonor zu fungieren. Das Benzoesäure-Derivat **Schl-33.759** wie auch das Nitro-Derivat **Schl-33.564** hatten beide einen schwachen Einfluss auf die Paarungsstabilität. Letzteres wirkte zudem schwach auf die Eiproduktion.



**Abbildung 111:** WMS und absolute Eizahlen von Schwefelsäurediamid-Derivaten mit zum Teil substituiertem Phenylpiperazin-Teilgerüst bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden

Während das unsubstituierte Phenyl-Derivat **Schl-33.438** weder Einfluss auf die Zellviabilität der HepG2- noch der LS174T-Zelllinie bis 100  $\mu\text{M}$  nahm, war der Methylphenoether **Schl-33.480** nur bis 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie unauffällig (**Abb. 112**). Damit ging die Derivatisierung am Phenylring zwar mit keinem signifikanten Aktivitätsgewinn einher, hatte aber eine unerwünschte zellschädigende Wirkung bei verringerten Konzentrationen zur Folge. Von einer weiteren Derivatisierung am Phenylpiperazin-Rest wurde somit abgesehen.

nicht zytotoxisch

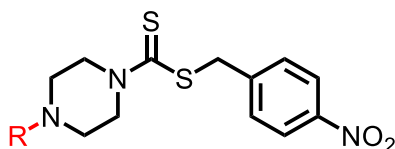


**Abbildung 112:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.438** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2- sowie der LS174T-Zelllinie und von **Schl-33.480** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie (zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie)

### Weitergehende Piperazin-Derivatisierung

Neben der Alkylierung und Arylierung des Piperazin-Teilgerüsts wurde dieses auch acyliert, sulfonyliert oder sulfamoyliert (**Tab. 23**).

**Tabelle 23:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivaten mit Acyl-, Sulfonyl- und Sulfamoyl-Piperazin-Teilgerüst (\*Ausbeute ausgehend vom Sulfonyl-/Sulfamoyl-Piperazin berechnet)

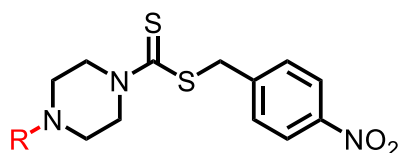


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
	39		49
<b>Schl-33.371</b>		<b>Schl-33.408</b>	
	38		51*
<b>Schl-33.390</b>		<b>Schl-33.758</b>	
	22		16*
<b>Schl-33.384</b>		<b>Schl-33.754</b>	
			25*
		<b>Schl-33.763</b>	

Das Piperazin wurde dabei zunächst derivatisiert, ehe es mit dem aktivierten Sulfonylbisimidazol in der Reaktionsfolge zu den Schwefelsäurediamiden als zweites Nucleophil umgesetzt wurde. Während die acylierten Piperazine kommerziell erhältlich waren, mussten die Sulfonamide aus dem entsprechenden Sulfonylchlorid und Boc-Piperazin selbst hergestellt werden. Die doppelten Schwefelsäurediamide entstanden im Falle des *N,N*-Dimethyl-sulfamoyl-Derivats **Schl-33.754** aus Boc-Piperazin und dem entsprechenden Sulfamoylchlorid. Die Synthese des Benzylsulfamoyl-Derivat **Schl-33.763** war etwas aufwendiger. Die erste Schwefelsäurediamid-Funktion war über eine modifizierte Syntheseroute zur Darstellung von Sulfamiden aus 1,1'-Sulfonylbis(2-methyl-1*H*-imidazol) und dem entsprechenden primären Amin, in diesem Fall Benzylamin, zugänglich. Einzelheiten werden im Abschnitt **3.4.2** über Schwefelsäurediamide aus primären Aminen beschrieben. In der Summe umfasste die Synthese dieses Derivats insgesamt 13 Stufen, wobei die einzelnen Edukte zunächst unabhängig voneinander (konvergent) bearbeitet werden konnten. Die letzten drei Synthesestufen brachten dann beide Reaktionspartner zusammen. Vor allem das Methylsulfonyl- (**Schl-33.408**; clogP = 0,46) und das *N,N*-Dimethylsulfamoyl-Derivat (**Schl-33.754**; clogP = 0,32) sollten in besonderer Weise zur Ausbildung von polaren Kontakten befähigt sein. *In vitro* waren die Derivate mit zweifach sulfamoyliertem Piperazin (**Schl-33.754** und **Schl-33.763**) die einzigen, die über 72 h immerhin schwach auf die Paarungsstabilität einwirkten.

Das Phenylpiperazin-Derivat **Schl-33.438** wurde nicht nur in 4-Position substituiert, sondern der Benzolring wurde auch durch die schwach basischen, elektronenarmen Stickstoff-Heterozyklen Pyridin (pK<sub>S</sub> = 5,2), Pyrimidin (pK<sub>S</sub> = 1,3), Pyrazin (pK<sub>S</sub> = 0,6) und Pyridazin (pK<sub>S</sub> = 2,3) ersetzt (**Tab. 24**). Die resultierenden Arylpiperazinsulfonyl-Derivate besitzen nun eine Amidin-, Guanidin- oder Amidrazon-Teilstruktur, im Fall des 1-(Pyridin-4-yl)piperazin-Derivats auch ein phenyloges Amidin. Damit sind sie stärker basisch als die bloßen Heterozyklen. Die pK<sub>S</sub>-Werte der Aminopyridine unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Position der Aminogruppe am Aromaten und der dadurch jeweils in unterschiedlicher Weise erhöhten Elektronendichte am Pyridin-Stickstoffatom (pK<sub>S</sub> = 6,8 (2-NH<sub>2</sub>-Pyridin), pK<sub>S</sub> = 6,0 (3-NH<sub>2</sub>-Pyridin), pK<sub>S</sub> = 9,1 (4-NH<sub>2</sub>-Pyridin)). Als Folge des zusätzlichen Imino-Stickstoffatoms im Ring, das wie ein -*M*-Substituent wirkt, resultiert für das Pyrimidin-2-amin demgegenüber ein pK<sub>S</sub>-Wert von 3,5 und für das Pyrazin-2-amin ein pK<sub>S</sub>-Wert von 3,1. Eine Wirkung durch Chelatisierung von Metall-Ionen ist durch die günstige Anordnung der Stickstoffatome zueinander denkbar, mit Ausnahme von **Schl-33.626/494**.

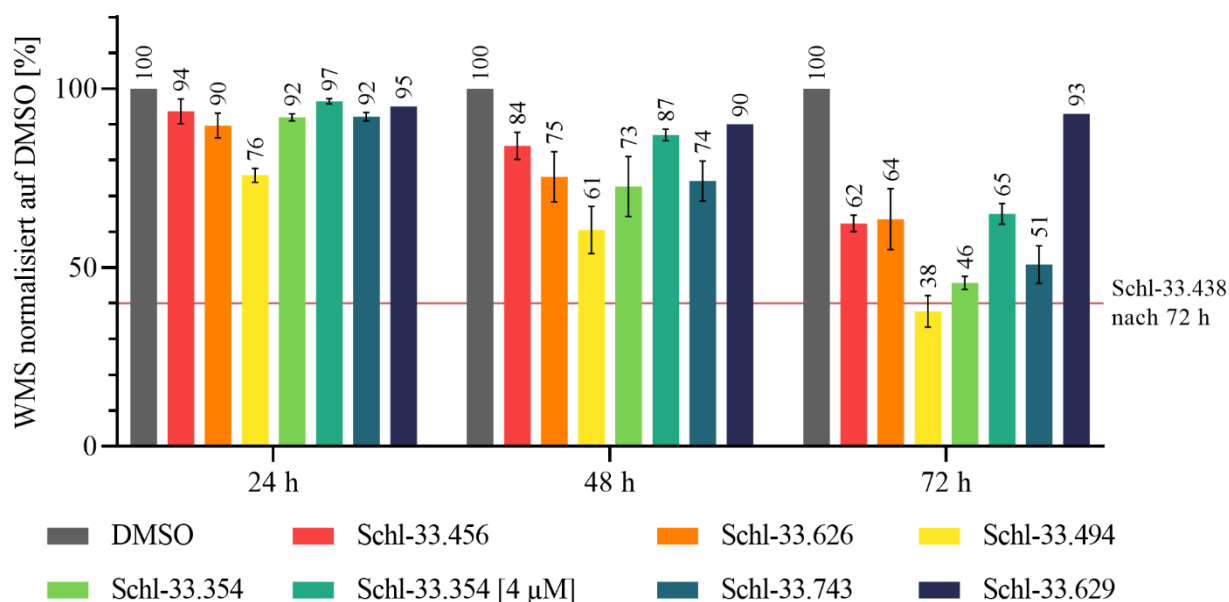


**Tabelle 24:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivaten mit Pyridinyl-, Pyrimidinyl-, Pyrazinyl-, Pyridazinyl-Piperazinsulfonyl-Teilgerüst


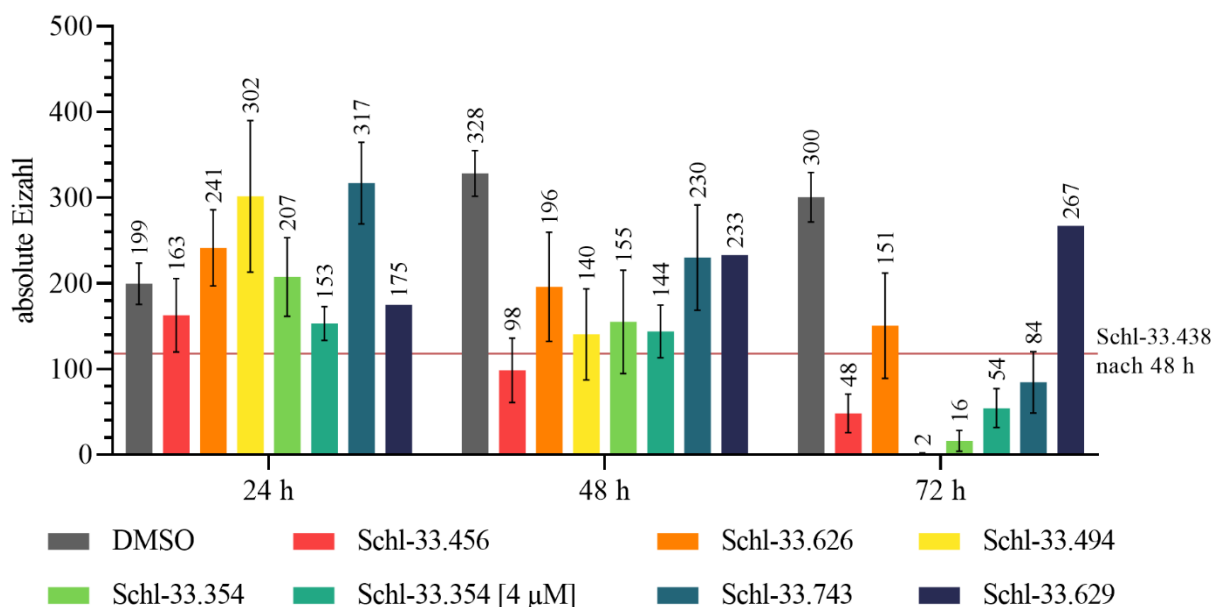
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.456	66	 Schl-33.354	12
 Schl-33.626	13	 Schl-33.743	45
 Schl-33.494	15	 Schl-33.629	16

Von den Pyridin-Derivaten war das *para*-substituierte Derivat **Schl-33.494** das aktivste. Es führte bei 10  $\mu\text{M}$  über 72 h zur vollständigen Reduktion der Eiproduktion (**Abb. 114**). Die Anzahl von Paaren war bereits nach 24 h auf einen Wert von 30% abgefallen. Nach 48 h waren schließlich alle Schistosomen entpaart. Die Motilität ging innerhalb von 48 h um 40% und dann nochmals um etwa 20% zurück (**Abb. 113**). Zuweilen kam es auch zu letalen Effekten. **Schl-33.494** bewirkte neben einer starken Tegumentschädigung mit einhergehender Blasenbildung und Ablösung des Teguments auch mittelschwere Darmdilatationen. Bei 5  $\mu\text{M}$  wurde indessen nur noch eine Anfälligkeit der Paare hinsichtlich der Entpaarung beobachtet. Vereinzelt traten weiterhin schwache Tegumentschäden auf. Das *ortho*- (**Schl-33.456**) wie auch das *meta*-substituierte Pyridin-Derivat **Schl-33.626** führten über 72 h in ähnlicher Weise zu einem etwa 35%-igen Rückgang der Beweglichkeit sowie einer 50-60%-igen Reduktion der Anzahl an Paaren. Während das 2-Pyridinyl-Derivat nach 48 h mittelstarke Darmdilatationen an den Weibchen auslöste, waren dies bei dem 3-Pyridinyl-Derivat Tegumentschäden mittlerer Intensität. Unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  führte nur noch **Schl-33.456** vereinzelt zu schwachen Darmdilatationen. Alle anderen Parameter blieben unverändert. Von den übrigen Stickstoff-Heterozyklen war das Pyridazinyl-Derivat **Schl-33.629** inaktiv, wohingegen das Pyrazinyl-Derivat **Schl-33.743** über 72 h zur Entpaarung von 7 Paaren und einer Restmotilität von 50% führte. Dilatationen des Darms und Schäden am Tegument waren schwach ausgeprägt und

traten nur vereinzelt, aber bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf. Die Inhibition der Eiproduktion war mit etwa 70 Eiern pro 24 h schwach ausgeprägt, aber bis zu 5  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Eine komplette Entpaarung sowie annähernd vollständige Reduktion der Eiproduktion wiederum erzielte das Pyrimidinyl-Derivat **Schl-33.354** bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Während die Schistosomen auch bei 2  $\mu\text{M}$  mit letztlich nur noch 2 Paaren deutlich zur Entpaarung neigten, ging die absolute Eizahl bis zu einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  auf etwa 55 Eier pro 24 h und damit drastisch zurück. Weiterhin reduzierte dieses Derivat die Motilität bei 10  $\mu\text{M}$  um etwa 50%, bei 4  $\mu\text{M}$  dann immerhin noch um 35%. Nimmt man alle Parameter zusammen, so lässt sich sagen, dass das Pyrimidinyl-Derivat **Schl-33.354** zumindest bei 10  $\mu\text{M}$  in seiner Aktivität mit dem Phenyl-Derivat **Schl-33.438** vergleichbar ist. Bei geringeren Konzentrationen war Ersteres (**Schl-33.354**) jedoch eindeutig überlegen und führte bis zu einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  zu einer eindeutigen antischistosomalen Wirkung. Die gute Wirksamkeit von **Schl-33.494**, das strukturell nicht zur Chelatisierung befähigt ist, macht indes deutlich, dass Chelatisierung als Wirkmechanismus der aktiven Schwefelsäurediamid-Derivate mit Stickstoff-Heterozyklus von untergeordneter Bedeutung ist.

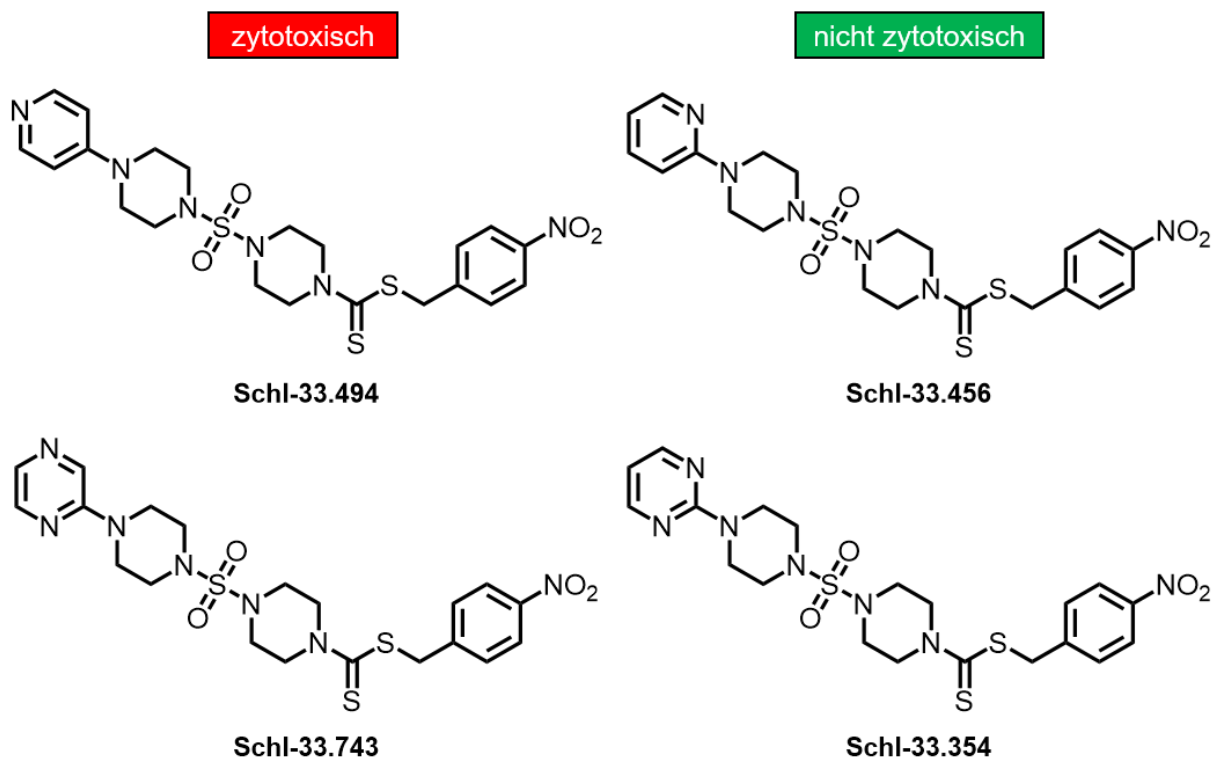


**Abbildung 113:** WMS der Schwefelsäurediamid-Derivate mit zusätzlichem Stickstoff-Heterozyklus bei (4  $\mu\text{M}$  und) 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 114:** Absolute Eizahlen der Schwefelsäurediamid-Derivate mit zusätzlichem Stickstoff-Heterozyklus bei (4 µM und) 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden

In der Zytotoxizitätsmessung wirkten das 1-(2-Pyridyl)piperazin- (**Schl-33.456**) und das 1-(2-Pyrimidyl)piperazin-Derivat **Schl-33.354** bis 100 µM nicht zytotoxisch auf Zellen vom Typ LS174T. **Schl-33.354** war zudem auch bis 50 µM nicht toxisch für HepG2-Zellen (**Abb. 115**). Das 1-(4-Pyridyl)piperazin- (**Schl-33.494**) und das 2-(Piperazin-1-yl)pyrazin-Derivat **Schl-33.743** waren hingegen bereits ab einer Konzentration von 50 µM zytotoxisch gegenüber HepG2-Zellen, wobei erstgenanntes Derivat hier auch zu einem Rückgang der Zellviabilität von LS174-Zellen führte. Damit nahm die Position des Stickstoff-Atoms im Ring nicht nur Einfluss auf die antischistosomale Aktivität, sondern auch die Zytotoxizität. In ähnlicher Weise gilt dies auch bei mehreren Stickstoff-Atomen im Ring. Hier ist deren Orientierung zueinander ebenfalls entscheidend.

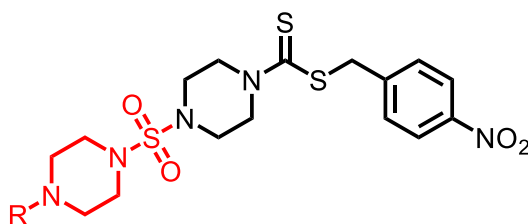


**Abbildung 115:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.743/494** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie (**Schl-33.494** zusätzlich auch gegenüber der LS174T-Zelllinie bei 50  $\mu\text{M}$ ) und von **Schl-33.456/354** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie (**Schl-33.494** zusätzlich auch gegenüber der HepG2-Zelllinie bei 50  $\mu\text{M}$ )

### Harnstoff- und Thioharnstoff-Substituenten am Piperazin-Teilgerüst

Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung des Piperazin-Stickstoffatoms war die Darstellung von Harnstoff- und Thioharnstoff-Derivaten. Diese entstanden aus Boc-Piperazin und den entsprechenden Iso(thio)cyanaten. Das genaue Vorgehen ist im Abschnitt 3.5 „Harnstoffe und Thioharnstoffe“ beschrieben. Auch hier wurde das Piperazin zunächst substituiert. Neben einem Ethyl- (**Schl-33.495**), Phenyl- (**Schl-33.757**), Benzyl- (**Schl-33.436**) und Phenethyl-Harnstoff-Derivat (**Schl-33.506**) entstand auch ein Benzyl-Thioharnstoff-Derivat (**Schl-33.578**) (**Tab. 25**).

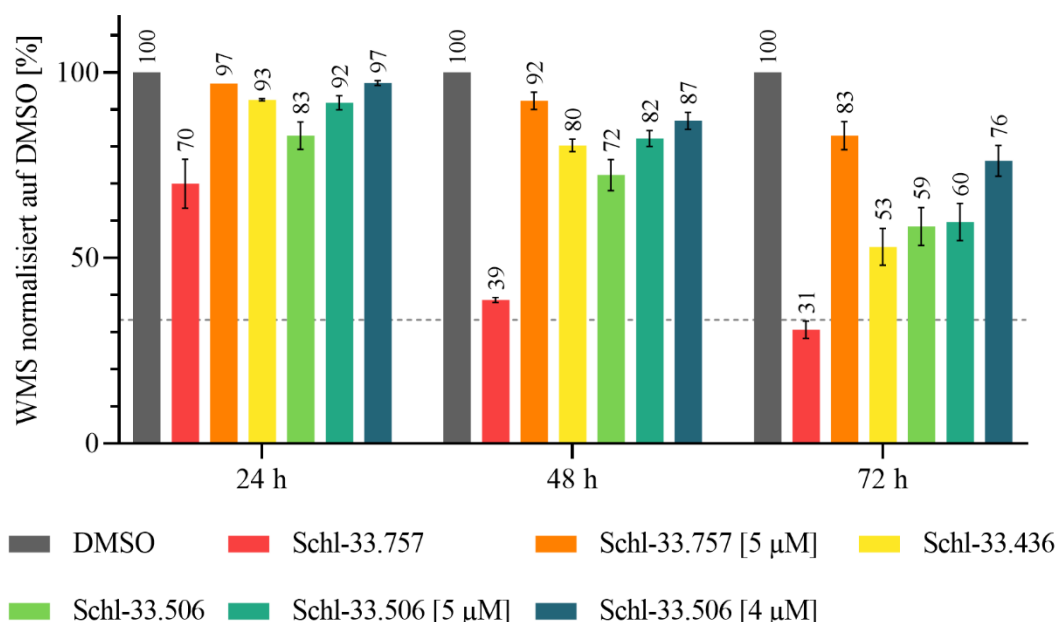
**Tabelle 25:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten von Schwefelsäurediamid-Derivaten mit Piperazin-Harnstoff- und Piperazin-Thioharnstoff-Teilgerüst (\*Ausbeute ausgehend vom Piperazin-Harnstoff berechnet)



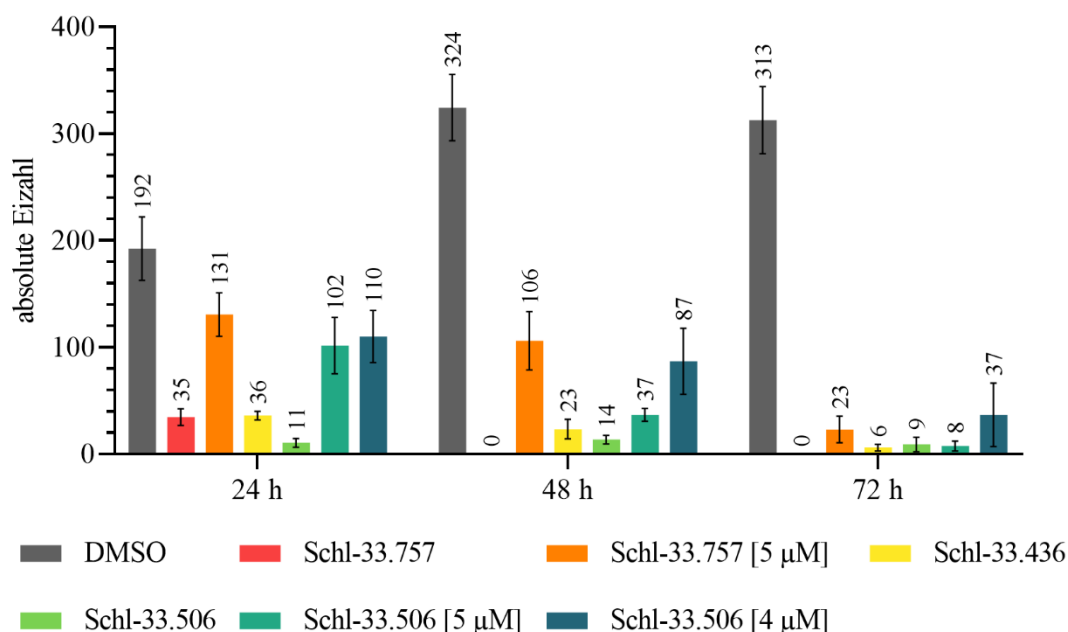
R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.495</b>	54*	 <b>Schl-33.578</b>	16*
 <b>Schl-33.757</b>	21*	 <b>Schl-33.506</b>	31*
 <b>Schl-33.436</b>	40*		

Das Ethyl-Harnstoff-Derivat **Schl-33.495** war bei der initial getesteten Konzentration von 10 µM inaktiv. Das Phenyl-Derivat **Schl-33.757** jedoch führte bereits innerhalb von 24 h neben schwachen Effekten auf die Entpaarung und die Motilität zu einer überaus signifikanten Reduktion der Eiproduktion (**Abb. 116+117**). Ab 48 h waren dann bereits 100% der Würmer entpaart, und es wurden keine Eier mehr gezählt. Die Motilität war über 60% zurückgegangen.

Innerhalb der nächsten 24 h traten dann auch letale Effekte zu Tage. Schwerste Darmdilataionen der Weibchen, die sich bereits nach 24 h abzeichneten, und Tegumentschäden mittlerer Stärke waren eine weitere Folge. Bei 5  $\mu\text{M}$  wurde dann nur noch die Eiproduktion über 72 h gehemmt. Zudem wurde die Paarungsbereitschaft schwach behindert und es kam nach etwa 48 h zu mittelstarken Dilatationen des Darms. Während das Benzylthioharnstoff-Derivat **Schl-33.578** unwirksam war, galt dies nicht für das Benzylharnstoff-Derivat **Schl-33.436**, welches ab der 72ten Stunde zu einer annähernd vollständigen Entpaarung der Schistosomen und einem merklichen Rückgang der Eiproduktion führte. Die Motilität wurde über 72 h um etwa 45% reduziert und es kam vereinzelt zu schwachen Schäden am Tegument und mittelstarken Darmdilatation. Noch aktiver war das Phenethylharnstoff-Derivat **Schl-33.506**, das die Motilität bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  um bis zu 40% reduzierte, die Eiproduktion und Paarungsstabilität sogar bis 4  $\mu\text{M}$ . Bei jener Konzentration wurden nach 72 h weniger als 40 Eier gelegt, zudem existierten nur noch 40% der zuvor 10 Schistosomenpaare. Starke Darmdilataionen vorwiegend der Weibchen entstanden bis zu 5  $\mu\text{M}$ , aber auch bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  konnten nach zumeist 48 h noch mittelstarke Darmdilataionen wahrgenommen werden.

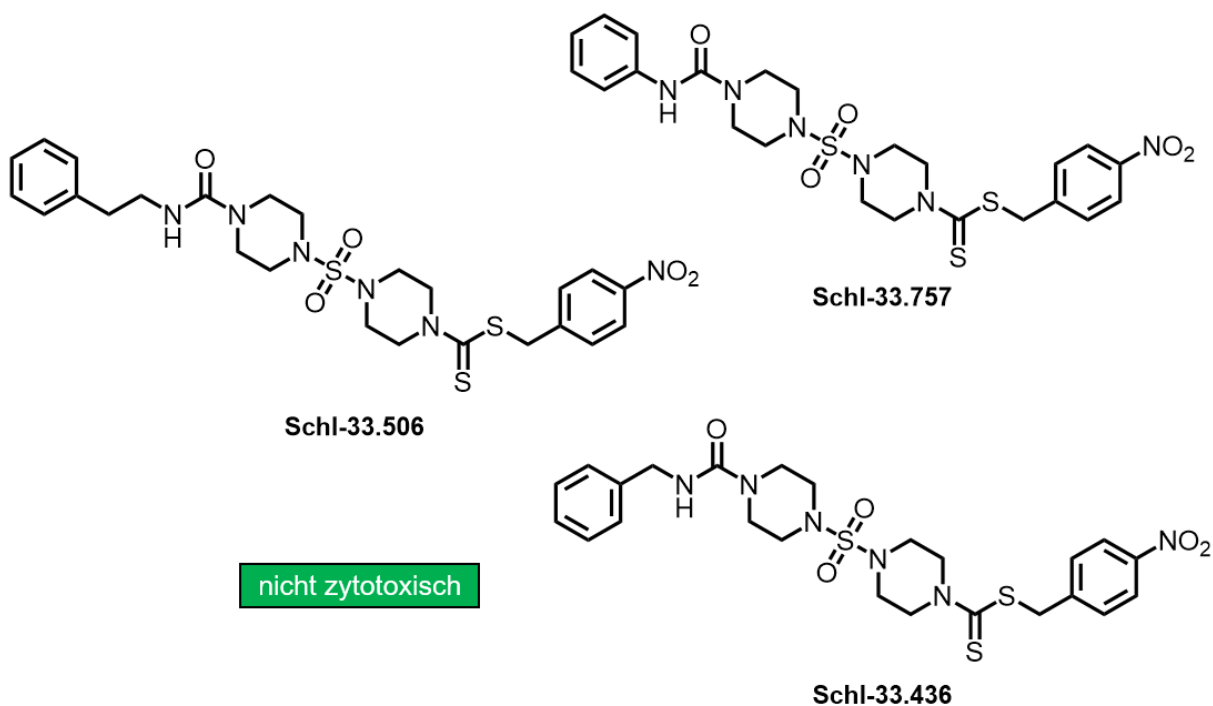


**Abbildung 116:** WMS der Schwefelsäurediamid-Derivate mit Piperazin-(Thio)harnstoff-Teilgerüst bei (4  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  bzw.) 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 117:** Absolute Eizahlen der Schwefelsäurediamid-Derivate mit Piperazin-(Thio)harnstoff-Teilgerüst bei (4 µM und 5 µM bzw.) 10 µM nach 24, 48 und 72 Stunden

Im Zell-basierten Assay war das Benzylharnstoff-Derivat **Schl-33.436** bis zu einer Konzentration von 50 µM nicht zellschädigend (**Abb. 118**). Das Phenylharnstoff-Derivat **Schl-33.757** indessen war auch bei 100 µM gegenüber der HepG2-Zelllinie nicht zytotoxisch. **Schl-33.506** wiederum zeigte keine Zytotoxizität bis 50 µM ausschließlich gegenüber der LS174T-Zelllinie. Für die HepG2-Zelllinie galt dies jedoch nicht.



**Abbildung 118:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.757** bei 100 µM sowie von **Schl-33.436** bei 50 µM gegenüber der HepG2-Zelllinie und von **Schl-33.506** bei 50 µM gegenüber der LS174T-Zelllinie (bei 50 µM zytotoxisch gegenüber der HepG2-Zelllinie)

Demnach war mit der Einführung eines Linkers am Harnstoff nicht nur ein Aktivitätssprung hinsichtlich der auf die Schistosomen niedrig wirksamsten Konzentration verbunden, wobei  $C_{\text{Benzyl}} < C_{\text{Phenyl}} < C_{\text{Phenethyl}}$  gilt, auch nahm die Zytotoxizität mit steigender Kettenlänge zu. Die effektive Löslichkeit indessen nahm mit steigender Kettenlänge ab.

**Abbildung 119** zeigt abschließend eine Auswahl der durch die Schwefelsäurediamide mit Phenylpiperazin- bzw. Piperazin-Harnstoff-Teilgerüst oder *N*-Heterozyklus verursachten Phänotypen.

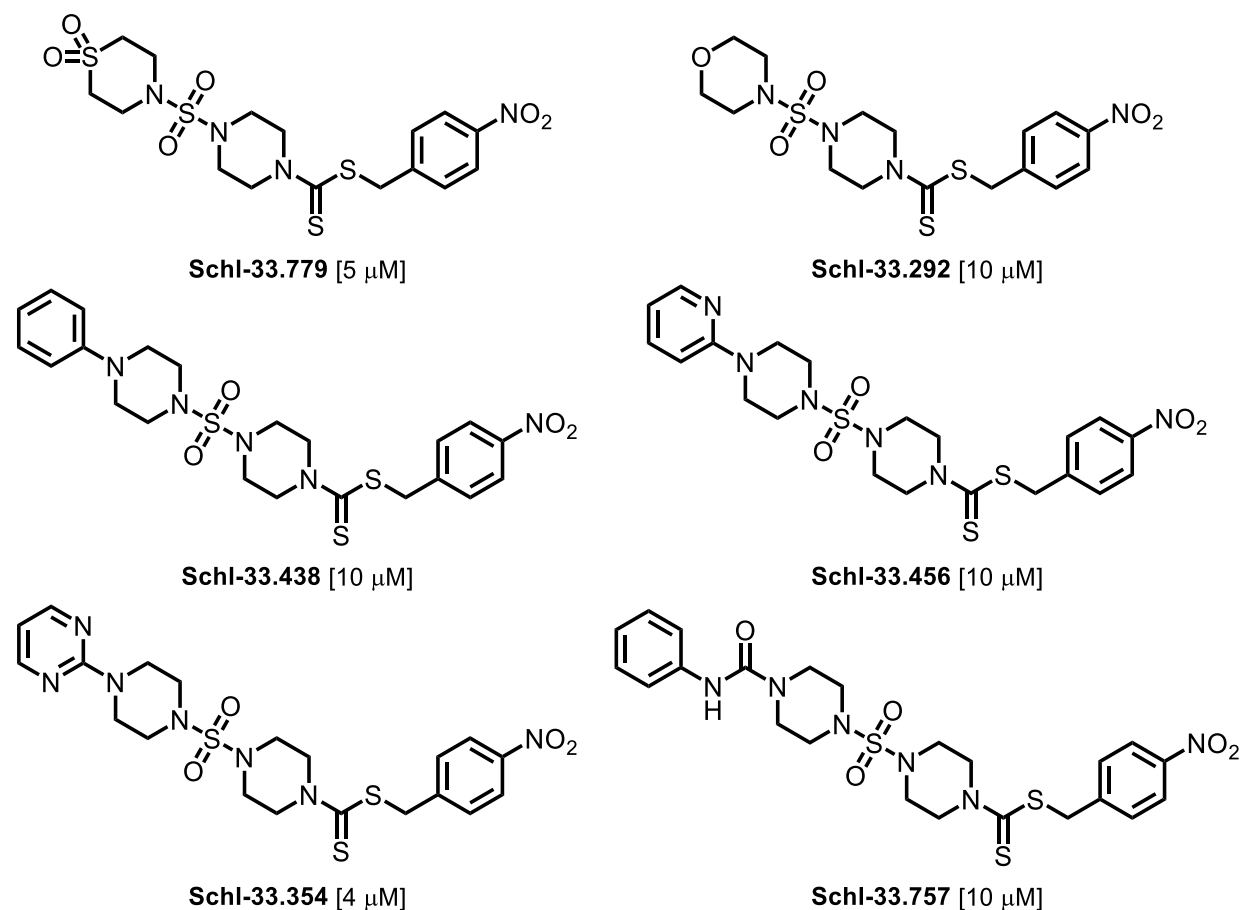


**Abbildung 119:** Exemplarische Phänotypen ausgewählter Schwefelsäurediamid-Verbindungen mit Phenylpiperazin- bzw. Piperazin-Harnstoff-Teilgerüst oder *N*-Heterozyklus bei 5 µM bzw. 10 µM nach 72 h; **Schl-33.354/757:** entpaarte Weibchen mit Darmdilataationen (im Bereich der Geschlechtsorgane); **Schl-33.456:** gepaartes Weibchen mit Darmdilataationen; **Schl-33.506:** zusätzlich ödematös aufgequollenes Männchen; **Schl-33.480:** Weibchen mit Warzen/Tegumentbläschen, Einschnürung am distalen Ende; **Schl-33.494:** reifenförmig aufgerolltes Männchen mit deutlichen Tegumentblasen und Tegumentablösung

Zusammenfassend waren von den Schwefelsäurediamiden, die von sekundären Aminen ausgingen und eine Piperidin-analoge Struktur besitzen, das Thiomorpholin-Dioxid-Derivat **Schl-33.779** und das Morpholin-Derivat **Schl-33.292** antischistosomal wirksam und bis 100 µM nicht zytotoxisch, was sie für weitere Profilierungen interessant erscheinen lässt (**Abb. 120**). Dabei war **Schl-33.779** in seiner Wirkung **Schl-33.292** überlegen. Weiterhin besitzen das Phenylpiperazin-Derivat **Schl-33.438** sowie die *N*-Heterozyklen **Schl-33.456** und **Schl-33.354** ein positives Aktivitäts- als auch Toxizitätsprofil, wobei hinsichtlich der Aktivität das Pyrimidinyl-Derivat dem Phenyl-Derivat und dieses wiederum dem 1-(2-Pyridyl)piperazin-



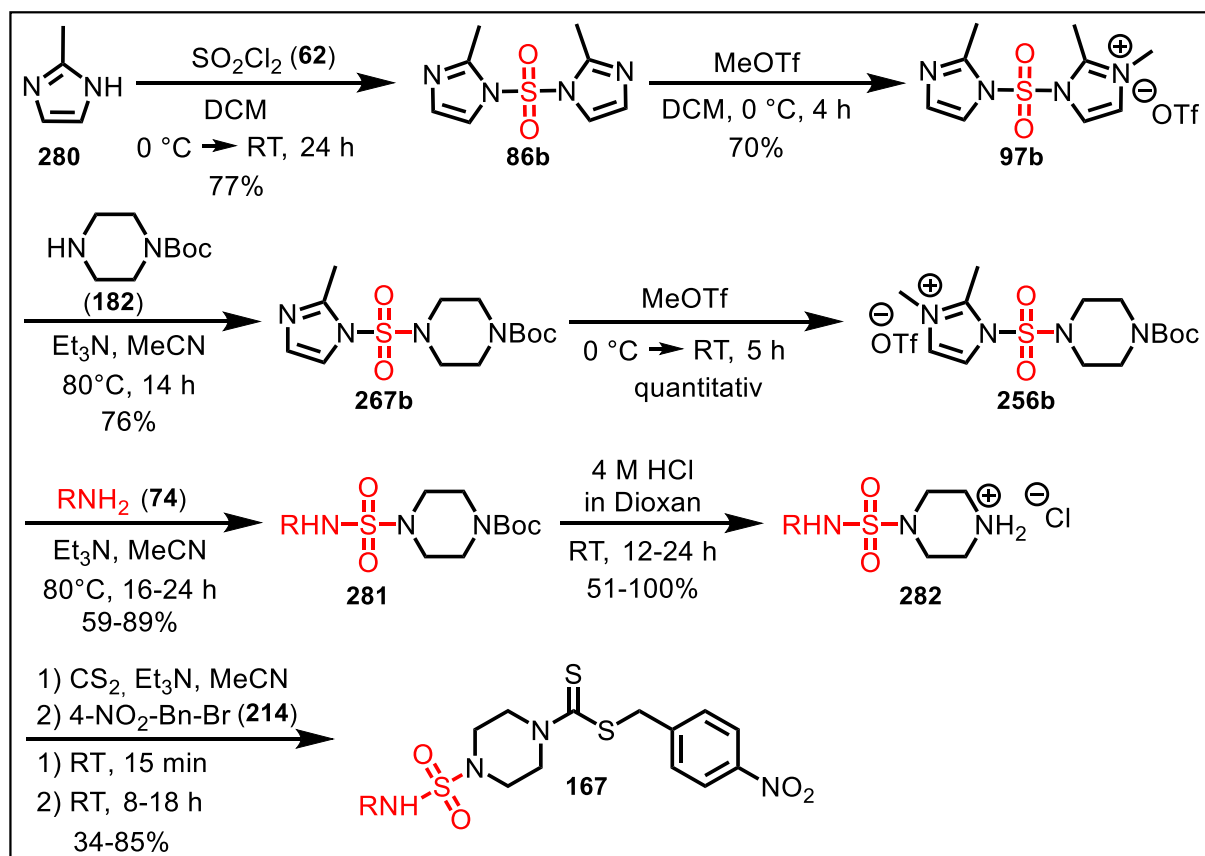
Derivat überlegen ist. Bezogen auf die Zytotoxizität ist indessen das Phenyl-Derivat dem Pyrimidinyl-Derivat vorzuziehen. Auch das Phenethylharnstoff-Derivat **Schl-33.757** zählt zu den verbliebenen Verbindungen.



**Abbildung 120:** Strukturformeln der wirksamsten und bis 100 µM nicht zytotoxischen Derivate der Schwefelsäurediamide aus sekundären Aminen und deren jeweils niedrig wirksamste Konzentration

### 3.4.2 Primäre Amine als Ausgangssubstanz

Zusätzlich zu sekundären Aminen wurden auch primäre Amine mit einem 1,1'-Sulfonylbisimidazol-Derivat zur Reaktion gebracht. Gemäß BEAUDION *et al.* sollte dieses eine Methylgruppe in der 2-Position tragen, um das während der Reaktion zwischenzeitlich gebildete Intermediat zu destabilisieren und die Reaktionsgeschwindigkeit damit zu erhöhen.<sup>[385]</sup> Dies ist gleichbedeutend mit der Verminderung von etwaigen Nebenprodukten und damit höheren Reaktionsausbeuten. 1,1'-Sulfonylbis(2-methyl-1*H*-imidazol) (**86b**) wurde hierfür zunächst aus 2-Methylimidazol (**280**) und Sulfurylchlorid (**62**) hergestellt. Ansonsten war die Reaktionsfolge zu der sekundärer Amine identisch. Nacheinander wurden die modifizierten Imidazol-Reste mit Methyltriflat alkyliert und dadurch in eine bessere Abgangsgruppe überführt. Diese wurden darauffolgend zunächst mit Boc-Piperazin (**182**) und dann mit einem ausgewählten primären Amin (**74**) umgesetzt. Das Entfernen der Boc-Schutzgruppe der Schwefelsäurediamid-Vorstufe **281** und die anschließende Umsetzung des resultierenden Amin-Hydrochlorids **282** führten zu den Dithiocarbamat-Derivaten **167** (Schema 53).

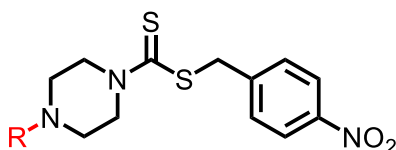


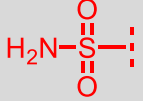
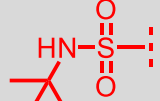
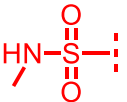
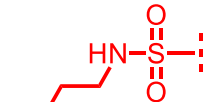
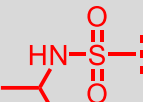

Schema 53: Reaktionssequenz zur Darstellung von Schwefelsäurediamid-Derivaten aus primären Aminen

### Derivate aus Monoalkylaminen

Begonnen wurde mit der Umsetzung aliphatischer Amine unterschiedlicher Länge und sterischen Anspruches wie Methylamin, Butylamin und Hexylamin sowie Isopropylamin und *tert*-Butylamin. In ähnlicher Weise wurde zudem auch Ammoniak mit dem Imidazoliumsalz **256b** zur Reaktion gebracht. Die Schwefelsäurediamid-Vorstufen **281** konnten dabei jeweils in guten Ausbeuten von 60-74% erhalten werden und wurden letztlich erfolgreich in die entsprechenden Dithiocarbamate **167** überführt (**Tab. 26**). Eine Schwefelsäurediamid-Vorstufe aus Cyclopropylamin und Propylamin wurden ebenfalls erhalten, konnten aber nicht zu den Dithiocarbamaten umgesetzt werden.

**Tabelle 26:** Strukturformeln und Ausbeuten der Schwefelsäurediamid-Derivate ausgehend von primären Alkylaminen



R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.461</b>	37	 <b>Schl-33.663</b>	35
 <b>Schl-33.450</b>	30	 <b>Schl-33.383</b>	52
 <b>Schl-33.458</b>	29	 <b>Schl-33.347</b>	30

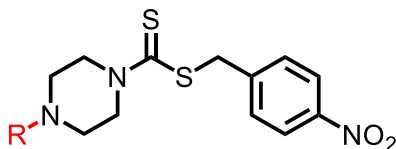
In der biologischen Testung blieben alle aliphatischen Schwefelsäurediamid-Derivate aus primären Aminen ohne Wirkung. Lediglich das Derivat aus Ammoniak (**Schl-33.461**) führte vereinzelt zu Entpaarungen und einer um 40% reduzierten Motilität nach 72 h.

### Derivate aus Alkylaminen mit polarer Kopfgruppe

Außer den oben beschriebenen primären aliphatischen Aminen wurden auch solche mit polarer Kopfgruppe wie Ethanolamin (clogP = 0,29), 2-Methoxyethylamin (clogP = 0,72) und

Glycinmethylester (clogP = 0,37) umgesetzt, deren Endprodukte in **Tabelle 27** aufgeführt sind. Jedoch waren auch die Derivate mit einer polaren Kopfgruppe gänzlich inaktiv.

**Tabelle 27:** Strukturformeln und Ausbeuten der Schwefelsäurediamid-Derivate ausgehend von primären Aminen mit polarer Kopfgruppe

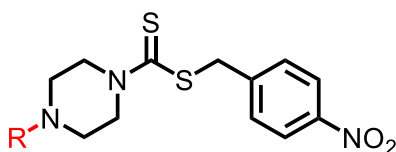


R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.451	29	 Schl-33.522	18	 Schl-33.603	47

### Derivate aus primären aromatischen Aminen und Arylalkylaminen

Noch bessere Ausbeuten von 82-89% bei der Umsetzung des Imidazoliumsalzes **256b** mit primären Aminen erzielten aromatische Amine wie 4-Morpholinanilin oder Arylalkylamine wie Benzylamin, 4-Picolylamin und 2-Thiophenmethylanilin, die ebenfalls in die Dithiocarbamate überführt werden konnten (**Tab. 28**).

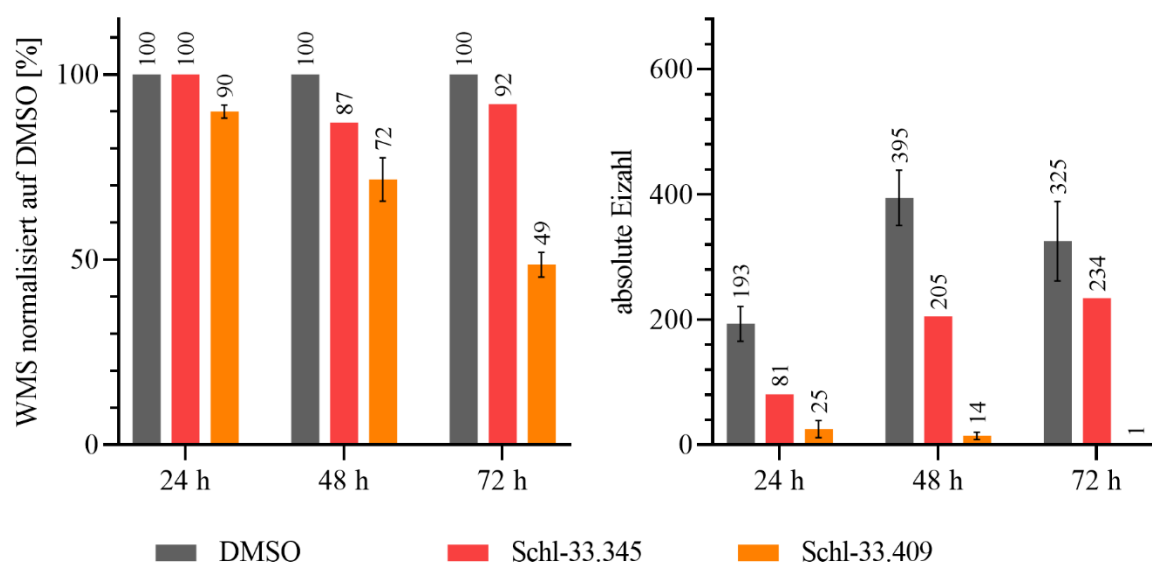
**Tabelle 28:** Strukturformeln und Ausbeuten der Schwefelsäurediamid-Derivate ausgehend von primären Aminen mit aromatischem Rest



R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.345	45	 Schl-33.409	21
 Schl-33.775	57	 Schl-33.380	26

Auch ein Furfurylamin-Derivat wurde in Form eines Schwefelsäurediamids erhalten, ergab aber letztlich nicht das gewünschte Dithiocarbamat.

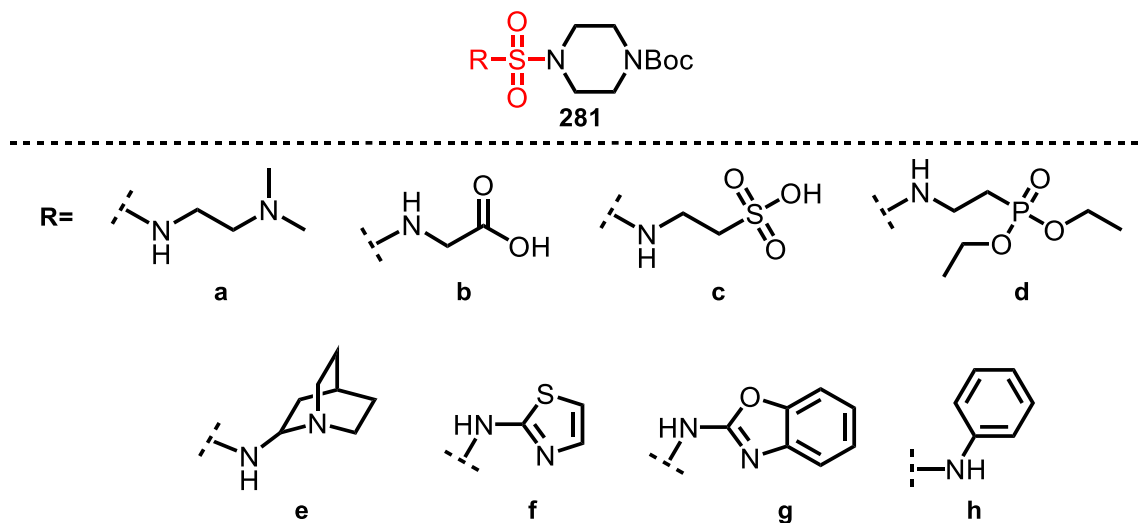
*In vitro* waren auch die Schwefelsäurediamide aus primären aromatischen Aminen bzw. Arylalkylaminen mit Ausnahme des 2-Thiophenmethylamin-Derivats **Schl-33.409**, das Bioisoster von **Schl-33.345**, bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  unauffällig. **Schl-33.409** führte bereits nach 24 h zu einer Reduktion der Eiproduktion auf 25 Eier (**Abb. 121**). Nach 72 h waren im Schnitt dann nur noch 3 von 10 Paaren vorhanden und die Motilität war um etwa die Hälfte zurückgegangen. Zudem traten vereinzelt schwache Tegumentschäden und bereits nach 48 h mittelschwere Darmdilatationen an den Weibchen auf. **Schl-33.409** zeigte allerdings bereits bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zellschädigende Wirkung.



**Abbildung 121:** WMS und absolute Eizahlen des Schwefelsäurediamid-Derivats aus Benzylamin im Vergleich zu dessen Bioisoster Thiophenmethylamin bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden

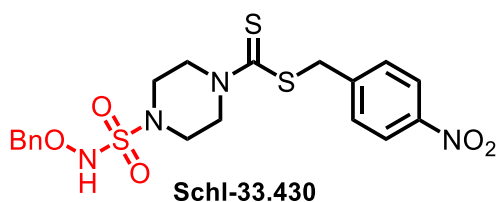
Im Gegensatz zu den Reaktionen mit sekundären Aminen führten die mit primären Aminen oftmals zu Problemen. So konnte eine Vielzahl von Aminen nicht erfolgreich zur Reaktion gebracht werden. Dies betrifft vor allem Amine mit einer polaren Gruppe wie *N,N*-Dimethylethylendiamin, Glycin, Taurin, Diethyl(2-aminoethyl)phosphonat und 3-Aminoquinuclidin (**Abb. 122**). Einige dieser Amine (**a+e**) besitzen ein weiteres nucleophiles Zentrum, ein tertiäres Amin, das tendenziell nucleophiler als ein primäres Amin ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass dieses jeweils mit dem Imidazoliumsalz **256b** eine Reaktion eingeht und es zum Austausch des Imidazols gegen das tertiäre Amin kommt. Das daraufhin entstehende quartäre Amin in der resultierenden Zwischenstufe wäre dann eine ebenso gute Abgangsgruppe. Aus sterischen Gründen wäre es vermutlich jedoch nicht zu einer weiteren Reaktion mit einem etwaigen Nucleophil befähigt. Vielmehr würde es nach wässriger Aufarbeitung in ein

Schwefelsäuremonoamid zerfallen. Auch die aromatischen Amine 2-Aminothiazol, 2-Aminobenzoxazol und Anilin (**f-h**) ließen sich mit dem Imidazoliumsalz **256b** nicht erfolgreich umsetzen. Dies ist vermutlich auf die geringe Nucleophilie der primären Amin-Stickstoffatome zurückzuführen, da die freien Elektronenpaare die Elektronendichte im Ring jeweils erhöhen.



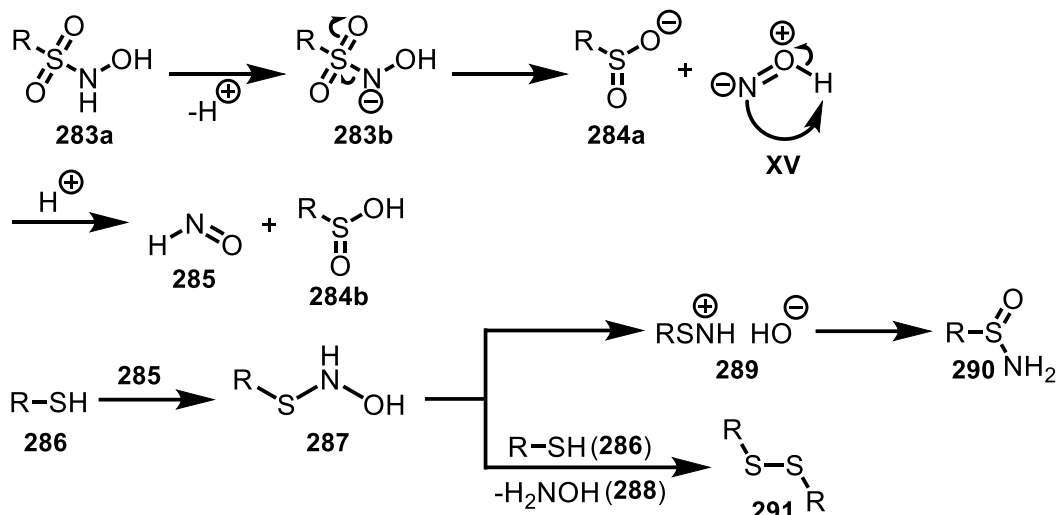
**Abbildung 122:** Eingesetzte Amine der fehlgeschlagenen Substitutionen

Abschließend wurde ein benzylgeschütztes *N*-Hydroxysulfamid-Derivat (**Schl-33.430**) dargestellt, das den Sulfhydroxamsäuren strukturell sehr ähnlich ist und womöglich in ähnlicher Weise reagiert (**Abb. 123**).



**Abbildung 123:** Struktur des benzylgeschützten *N*-Hydroxysulfamid-Derivats

Sulfhydroxamsäuren (**283a**) lassen sich unter basischen Bedingungen deprotonieren, was zur Freisetzung von Nitrosowasserstoff (**285**) führt.<sup>[523]</sup> HNO seinerseits ist in der Lage beispielsweise mit der Thiolgruppe eines Cysteins (**286**) unter Bildung von Hydroxysulfenamid (**287**) zu reagieren. Das Hydroxysulfenamid wiederum kann mit einer weiteren Thiolgruppe in ein Disulfid (**291**) übergehen oder es zerfällt unter Abspaltung eines Hydroxid-Ions zu einem Alkyliminosulfonium-Ion (**289**), das im wässrigen Medium Sulfinamid (**290**) ergibt (**Schema 54**).<sup>[524,525]</sup> Die dabei erfolgten Reaktionen sind irreversibel und können massiven Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms nehmen, was etwaige Wirkungen am Parasiten zur Folge haben könnte.

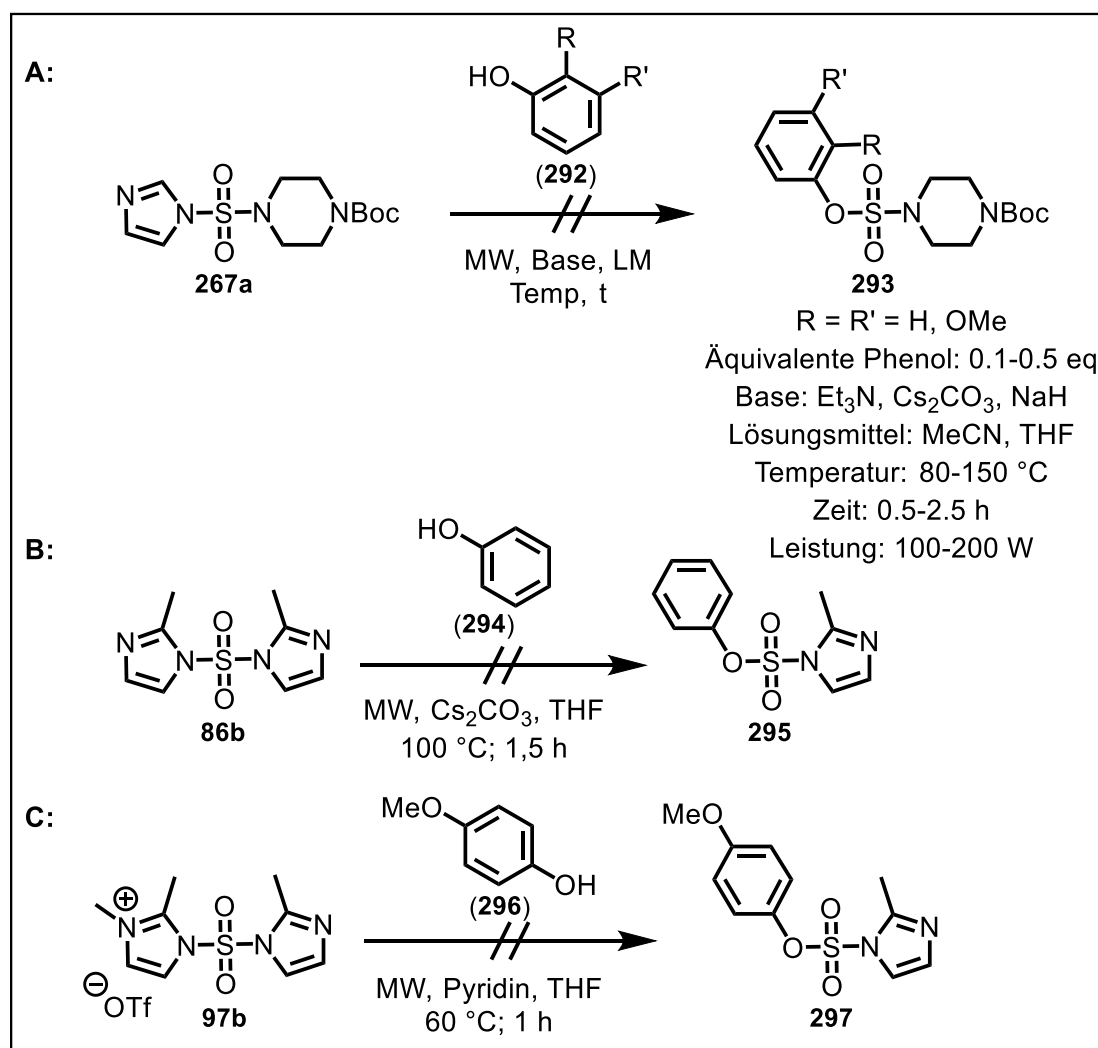


**Schema 54:** HNO-Freisetzung aus Sulhydroxamsäuren und Reaktion von HNO mit Thiolen<sup>[524,525]</sup>

Es wurde das Reaktionsprodukt aus *O*-Benzylhydroxylamin und Imidazoliumsalz **256b** erhalten. Die Benzylschutzgruppe, die einem nucleophilen Angriff über das Sauerstoff-Atom entgegenwirken sollte, konnte final aber nicht entfernt werden. Weder die Hydrogenolyse auf Stufe der Schwefelsäurediamid-Vorstufe noch auf der des Dithiocarbamats gelang, sodass eine Testung des benzylgeschützten *N*-Hydroxysulfamid-Derivats **Schl-33.430** vorgenommen wurde, da eine enzymatische Etherspaltung ebenso möglich erschien. *In vitro* war **Schl-33.430** allerdings unwirksam. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der relativ stabile Benzylether nicht gespalten wurde oder dass eine Freisetzung von HNO wie bei den Sulhydroxamsäuren nicht erfolgt war. Für Folgearbeiten wäre eine andere Schutzgruppe wie beispielsweise ein Silylether zu empfehlen. Die Synthese mit einem *N*-Methylhydroxylamin als Referenzsubstanz ließ sich ebenfalls nicht realisieren. Inzwischen konnte allerdings in der Masterarbeit von M. KLÜPPEL gezeigt werden, dass Sulhydroxamsäuren wie die *Pilotysche*-Säure (*N*-Hydroxybenzolsulfonamid), von denen man weiß, dass sie HNO freisetzen, die Parasiten hinsichtlich ihrer Vitalität und Motilität nicht beeinflussen.<sup>[526]</sup>

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Syntheseroute für die Darstellung von unsymmetrischen Schwefelsäurediamid-Derivaten ausgehend von 1,1'-Sulfonylbisimidazol gefunden wurde. Deren Besonderheit ist die selektive Alkylierung von jeweils nur einem Imidazol-Rest, die letztlich zur Monosubstitution führt. Eine Ausweitung der Syntheseroute auf Hydrazine war allerdings nicht erfolgreich, was unter anderem daran lag, dass die Reaktion mit Hydrazin zur Zersetzung der Edukte führte. Analog zu der Reaktion mit Aminen wurde eine Substitution mit Phenolen versucht, wobei das 1,1'-Sulfonylimidazol-(*N*-Boc-Piperazin) **267a**, angelehnt an eine Vorschrift von REUILLON *et al.*, jedoch nicht mit Methyltriflat aktiviert wurde.<sup>[527]</sup> Die Reaktion wurde sowohl mit unsubstituiertem Phenol als auch mit

2,3-Dimethoxyphenol (**292**) in unterschiedlichen äquimolaren Verhältnissen vorgenommen. Dabei wurden als Lösungsmittel Acetonitril sowie Tetrahydrofuran gewählt, um somit indirekt Einfluss auf die Nucleophilie des Phenols zu nehmen. Die Temperatur wurde zwischen 80 °C und 150 °C variiert. Als Basen fanden Triethylamin, Cäsiumcarbonat und Natriumhydrid Verwendung, welche allesamt in der Lage sein sollten, das Phenol in das Phenolat zu überführen. Es konnte jedoch bei keinem der Ansätze das gewünschte Produkt **293** nachgewiesen werden (**Schema 55, A**). Außerdem wurde eine Reaktion von Phenol (**294**) mit 1,1'-Sulfonyl-bis(2-methyl-1*H*-imidazol) (**86b**) und Cäsiumcarbonat als Base durchgeführt, die gleichwohl scheiterte (**Schema 55, B**). Erfolglos lief auch eine Reaktion des aktivierten 1,1'-Sulfonylbis(2-methyl-1*H*-imidazol)-Derivats **97b** mit *para*-Methoxyphenol (**296**) und Pyridin (**Schema 55, C**). Alle Reaktionen waren mikrowellenunterstützt.



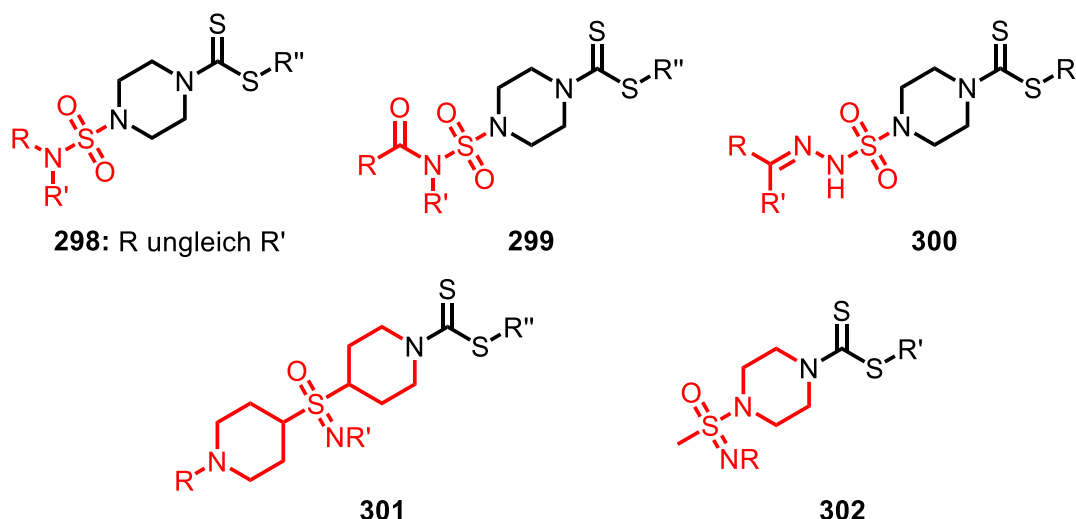
**Schema 55:** Gescheiterte Versuche der Ausweitung der Syntheseroute für unsymmetrische Schwefelsäurediamide auf Phenole

Die Reaktion der Phenole zu *O*-Arylsulfamaten scheiterte womöglich zum einen an der mäßigen Nucleophilie der Phenole, wenngleich eine elektronenschiebende Methoxy-Gruppe



theoretisch eine erhöhte Nucleophilie zur Folge haben sollte. Zum anderen könnten die hohen Temperaturen aber auch zu einer Eliminierung des zuvor eingeführten Phenols geführt haben. Weitere Literaturstellen belegen eine Reaktionsführung bei teilweise niedrigeren Temperaturen wie etwa Raumtemperatur.<sup>[528–530]</sup> Aliphatische Alkohole kommen als Reaktionspartner nicht in Frage, da die resultierenden Sulfamate vermutlich als Alkylantien zytotoxisch sind und ihre Alkylgruppe in Amino-, Hydroxyl- oder Phosphatgruppen der Ribonukleinsäuren der DNA einbauen, wodurch die Zellteilung gehemmt wird. Amidosulfonsäurethioester, die durch Reaktion mit den nucleophileren Thiolen entstehen, unterliegen diesem Mechanismus nicht, sind aufgrund der besseren Abgangsgruppe dafür aber hydrolyseanfälliger und somit vermutlich weniger stabil.

Als weitere Möglichkeit zur Optimierung bietet sich an dieser Stelle die Synthese von Schwefelsäurediamiden aus sekundären, unterschiedlich verzweigten Aminen an (**298**). Ebenso ist die Synthese von *N*-Acylsulfamiden (**299**) oder Sulfonylhydrazonen (**300**) denkbar. Auch könnte der Austausch des Sulfonamid- beziehungsweise des Schwefelsäurediamid-Motivs gegen ein Sulfoximin (**301**) oder Sulfonimidamid (**302**) vollzogen werden (**Abb. 124**). Vor allem die Substanzklassen der Sulfoximine und *N*-Acylsulfamide erfreuen sich in der Medizinalchemie in jüngster Vergangenheit besonderer Beliebtheit.<sup>[531,532]</sup>



**Abbildung 124:** Mögliche Strukturen zur weiteren Optimierung der Schwefelsäurediamid-Derivate

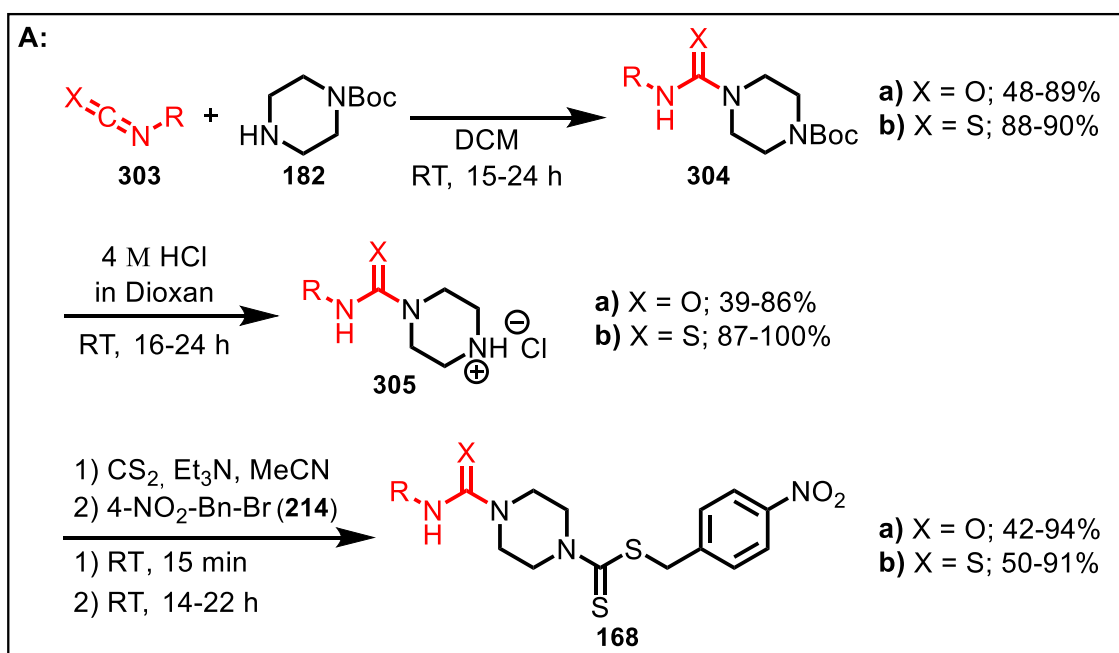
### 3.5 Harnstoffe und Thioharnstoffe

#### 3.5.1 Syntheserouten zur Darstellung von Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivaten

In der Arbeit von P. MÄDER wurden neben Sulfonamiden auch Carbonsäureamide am endständigen Piperazin-Stickstoffatom geduldet.<sup>[286]</sup> So wirkte sich die Acylierung und damit der Verlust des basischen Charakters des Piperazins positiv auf die Wirksamkeit aus. Insbesondere Carbonsäureamide, die aus den proteinogenen Aminosäuren dargestellt wurden, erwiesen sich als wirksam. Somit stellte sich die Frage, ob ein weiteres Stickstoffatom zwischen dem Carbonylkohlenstoffatom des Carbonsäureamids und dem organischen Rest geduldet wird. Im Einzelnen war also zu klären, inwieweit ein Piperazin-Harnstoffderivat zu einer Wirkungssteigerung führen kann. Zuversichtlich stimmten dabei (unter Vernachlässigung einer biotransformativen Verstoffwechslung) die positiven Testergebnisse eines Boc-geschützten Piperazin-Derivats, also eines Carbamats, in welchem anstelle des weiteren Stickstoffatoms ein Sauerstoffatom Verwendung fand. Auch sind in der Literatur bereits *N,N'*-Diarylharnstoffe beschrieben, die gegen *S. mansoni* und *S. japonicum* wirken.<sup>[533–536]</sup>

#### Syntheseroute A

Für die Synthese der Harnstoff-Derivate wurden mehrere Syntheserouten entwickelt. Eine zunächst verfolgte Route (A), die sich an einer Vorschrift von KEITH *et al.* orientiert, ging von kommerziell erhältlichen Isocyanaten (**303**) aus.<sup>[537]</sup> Unter Schutzgasatmosphäre wurden diese mit Boc-Piperazin (**182**) ohne weiteren Zusatz umgesetzt (Schema 56).

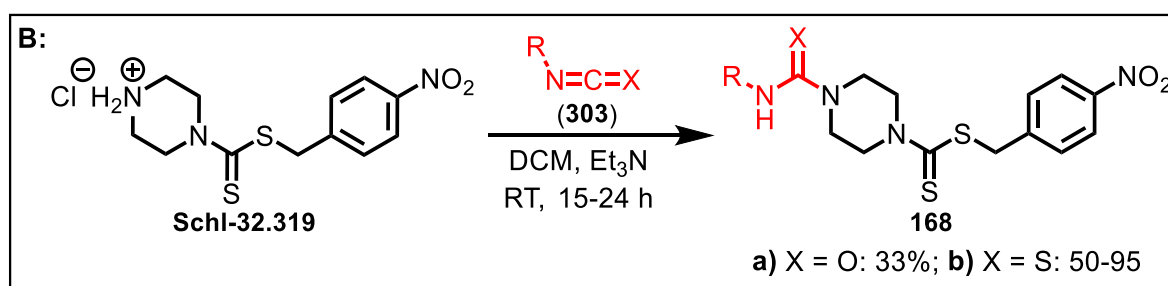


**Schema 56:** Reaktionssequenz zur Darstellung von Piperazin-(Thio)-Harnstoffderivaten ausgehend von Boc-Piperazin

Der Ausschluss von Wasser bei dieser Reaktion ist essenziell, da sonst instabile Carbamidsäuren entstehen, die unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid zu Aminen zerfallen. Insgesamt verliefen die nucleophilen Additionsreaktionen mit akzeptablen Ausbeuten. Ausbeuteverluste sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Isocyanate insbesondere aromatischer Natur leicht dimerisieren und Uretidione bilden.<sup>[538]</sup> Neben Isocyanaten wurden auch Isothiocyanate zur Reaktion gebracht. Der Unterschied in den Ausbeuten steht dabei im Gegensatz zur Carbonylaktivität, das heißt der Elektronegativitätsdifferenz von Sauerstoff und Schwefel, welche einen Unterschied der Partialladung am Carbonylkohlenstoff-Atom bedingt. So sollte der Carbonylkohlenstoff im Isothiocyanat etwas weniger positiviert und damit weniger elektrophil sein. Das resultierende Boc-Piperazin-Harnstoffderivat wurde nach Boc-Entschützung zu den Dithiocarbamten umgesetzt. Ein Vorteil der Syntheseroute bestand darin, dass sich die Boc-Piperazin-Harnstoffderivate oftmals durch Umkristallisation einfach reinigen ließen.

### Syntheseroute B

In einer anderen Synthesesequenz (**B**) hatte das Isocyanat/Isothiocyanat (**303**) das Piperazin-Hydrochlorid-Derivat **Schl-32.319** als Reaktionspartner anstelle von Boc-Piperazin. Unter Basenkatalyse mit Triethylamin wurde hier die Harnstoff-Funktion anstelle des Dithiocarbamats im letzten Schritt der Reaktionssequenz aufgebaut (**Schema 57**). Insbesondere ein Allyl-Derivat (**Schl-33.304**) wurde auf diese Weise dargestellt, da die vorherige Route nach Boc-Entschützung ein Halogenalkan als Nebenprodukt hervorbrachte. Es war also eine elektrophile Addition an die Doppelbindung erfolgt.



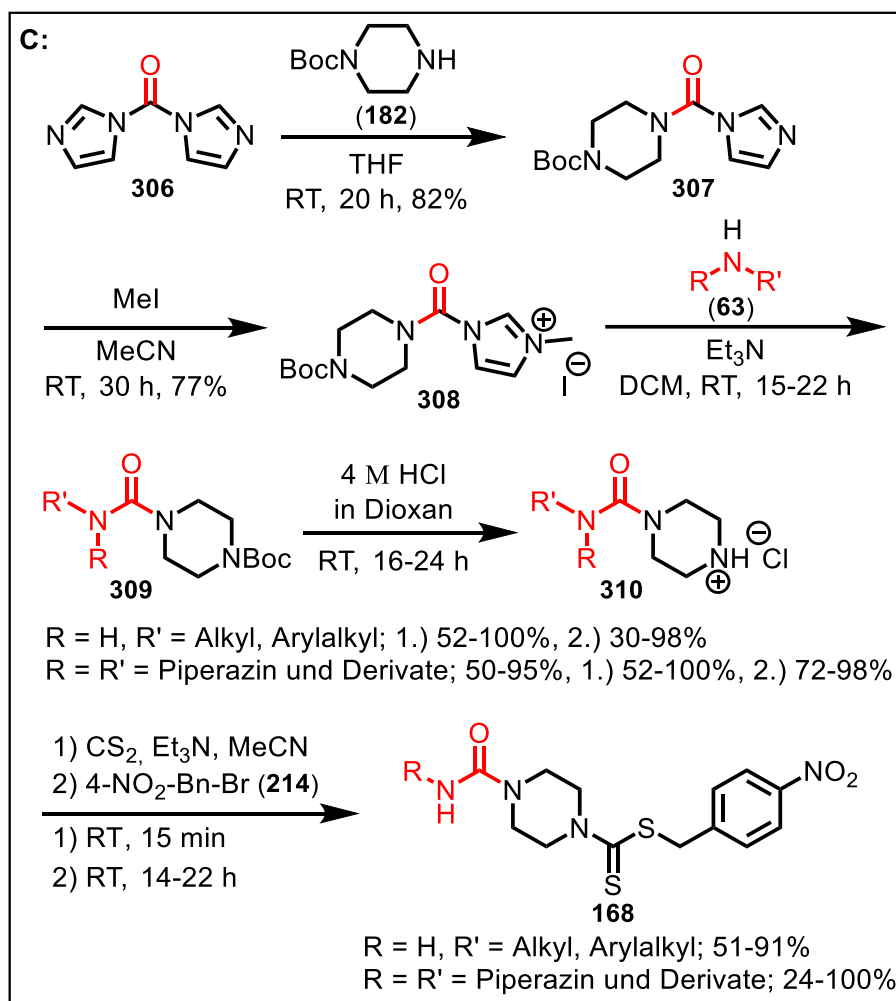
**Schema 57:** Reaktionssequenz zur Darstellung von Piperazin-(Thio)-Harnstoffderivaten ausgehend von Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** unter Basenkatalyse

Eine breite Anwendung fand diese Reaktionssequenz allerdings nicht, da mit ihr ein größerer Aufwand bei der Aufarbeitung verbunden war. Es wurde die Feststellung gemacht, dass sich die Dithiocarbamat-Derivate von Verunreinigungen nur schlecht abtrennen ließen und so eine Vielzahl von Reinigungsschritten erforderlich war. Der Vorteil dieser Route liegt allerdings darin, dass sich die Vorstufe in großem Maßstab darstellen lässt und eine Variation der verschiedenartigen Reste auf der letzten Stufe in der Summe dann weniger Synthesestufen

erfordert. Das größere Dithiocarbamat-Molekül führte während der Synthese des Harnstoff-Derivats jedoch zu geringen Ausbeuten im Vergleich zur Route A mit dem kleinen Boc-Piperazin. Beide Synthese-Varianten, die von Isocyanaten/Isothiocyanaten ausgingen, ermöglichten lediglich die Darstellung von trisubstituierten Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivaten. Tetrasubstituierte Verbindungen waren auf diesem Weg nicht zugänglich.

### Syntheseroute C

Eine dritte Reaktionssequenz (C) nach OTRUBOVA *et al.* ermöglichte die Herstellung auch derartiger Derivate.<sup>[539]</sup> Mittels 1,1'-Carbonyldiimidazol (**306**) konnten sowohl tri- als auch tetrasubstituierte Harnstoffe (**168**) dargestellt werden, was durch die Reaktion mit primären beziehungsweise sekundären Aminen (**63**) geschah. Die beiden Imidazolreste wurden dabei sequenziell durch Stickstoffnucleophile ausgetauscht. Das Boc-Piperazin (**182**) diente als erster Reaktionspartner (Schema 58).

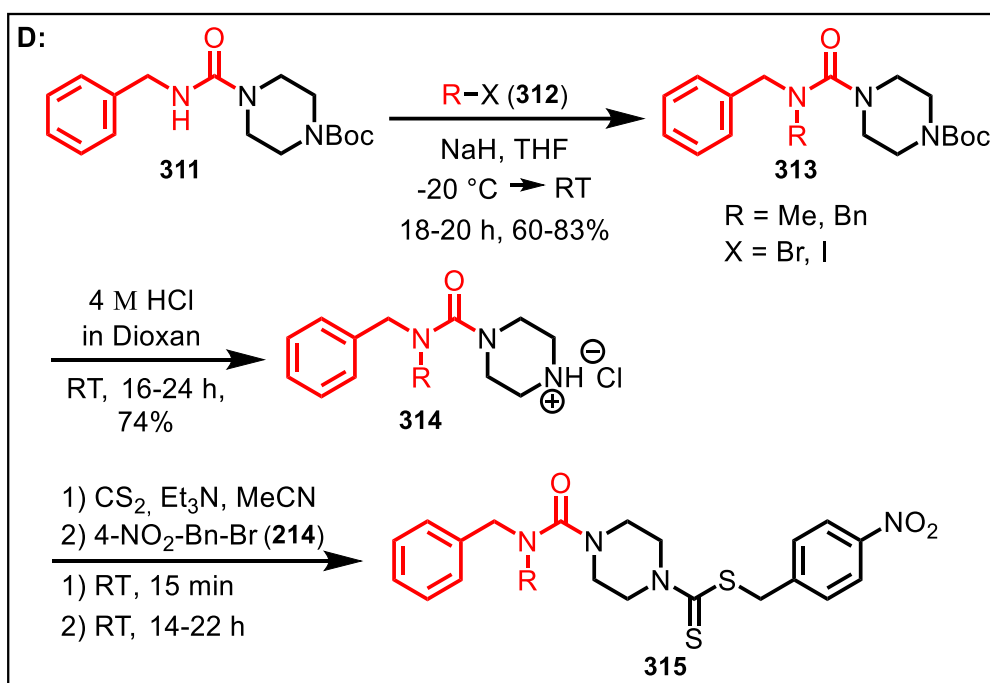


**Schema 58:** Reaktionssequenz zur Darstellung von Piperazin-Harnstoffderivaten ausgehend von 1,1'-Carbonyldiimidazol

Eine umgekehrte Reihung der Nucleophile wurde als weniger sinnvoll erachtet, da sich **308** in größerem Umfang darstellen ließ und davon ausgehend eine Derivatisierung problemlos möglich war. Bei einer Umkehr der Reaktionsfolge wären viele kleine Reaktionsansätze von Nöten gewesen. Die jeweils neu angefallenen Produkte hätten jeweils umfassenden analysiert werden müssen. Ferner wurde die Beobachtung gemacht, dass vor allem primäre Amine nicht ohne Weiteres mit dem 1,1'-Carbonyldiimidazol reagierten. Das nucleophilere, sekundäre Amin Boc-Piperazin, das zwei *+I*-Substituenten trägt, reagierte wie erwartet. Die Umsetzung der primären Amine mit dem aktivierten Imidazol funktionierte hingegen einwandfrei. Da die Reaktion mit dem Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** im Falle der Darstellung von Bispiperazinyl-Derivaten wiederum zu Problemen hinsichtlich der Reinigung der Reaktionsprodukte führte, wurde auch in diesem Fall entsprechend kleinschrittig vorgegangen. Eine Ausnahme stellt ein mono-Boc-Bispiperazinyl-Derivat (**Schl-33.331**) dar. Etwas aufwendiger gestaltete sich die Synthese von Harnstoff-Derivaten mit einem zusätzlichen polaren Rest wie etwa **Schl-33.422** mit einem Hydroxyethyl-Rest oder **Schl-33.330** mit einem Methylsulfonyl- und **Schl-33.776** mit *N,N*-Dimethylsulfamoyl-Rest. Während sich die Ausbeuten der Harnstoff-Derivate ausgehend von primären Aminen nur unwesentlich von denen der sekundären Amine unterschieden, traf dies nicht auf die darauffolgende Boc-Entschützung zu. Die trisubstituierten Harnstoff-Derivate fielen gegenüber den tetrasubstituierten Harnstoff-Derivaten deutlich öfter in mäßigen Ausbeuten an und machten vereinzelt starke Probleme bei der Reinigung. Besonders deutlich traf dies auf ein Furfuryl- und 2-Thiophenmethyl-Derivat (**Schl-33.721** und **Schl-33.723**) zu. Die Empfindlichkeit des Furans gegenüber Säuren ist bekannt und führte wohl zu dessen teilweiser Hydrolyse, woraufhin ein 1,4-Ketoaldehyd entstand. Die Aldehyd-Funktion polymerisierte dann vermutlich sofort zu Substanzen unbekannter Konstitution. Bispiperazinyl-Harnstoff-Derivate mit einem Alkylsubstituenten und damit einem basischen Stickstoff-Atom (**Schl-33.416**, **Schl-33.422**, **Schl-33.773** und **Schl-33.777**) führten im Zuge der sauren Entschützung zur Bildung von Dihydrochloriden, die oftmals stark hygroskopisch und damit schwer zu isolieren waren. Die abschließende *one-pot*-Reaktion mit Kohlenstoffdisulfid ergab Reaktionsprodukte in mäßigen bis guten Ausbeuten zwischen 48% und 100%. Einzig ein 1-(Cyclopropylcarbonyl)piperazin-Derivat (**Schl-33.355**) weicht mit nur 24% stark davon ab. Ein Trend bezüglich der Ausbeuten ist aber nicht zu erkennen.

### Syntheseroute D

Als vierte Syntheseroute (**D**) wurde die Alkylierung von trisubstituierten Harnstoff-Derivaten genutzt (**Schema 59**). Damit lassen sich zusätzliche Alkyl-/Arylalkyl-Substituenten an einem monosubstituierten Stickstoffatom einführen. Dies stellt somit eine weitere Möglichkeit neben der Umsetzung von 1,1'-Carbonyldiimidazol mit sekundären unsymmetrischen Aminen dar. Letztere müssen jedoch zumeist erst durch Kondensation eines primären Amins mit einem Aldehyd und darauffolgender Reduktion des erhaltenen Imins (reduktive Aminierung) dargestellt werden, was einen synthetischen Mehraufwand bedeutet. Die Synthese wurde ausschließlich an einem Benzylharnstoff-Derivat (**Schl-33.242/Schl-33.272**) erprobt. Dieses besitzt einen  $pK_S$ -Wert von etwa 14 (in DMSO:  $pK_S = 27$ ) und wurde mit Natriumhydrid ( $pK_S = 35$ ) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  deprotoniert. Sodann wurde es mit Methyljodid oder Benzylbromid alkyliert. Infolge der besseren Abgangsgruppe  $\text{I}^-$  gegenüber  $\text{Br}^-$  führte die Synthese mit dem Methyljodid zu einer höheren Ausbeute.



**Schema 59:** Reaktionssequenz zur Darstellung von tetrasubstituierten Piperazin-Harnstoffderivaten durch Alkylierung

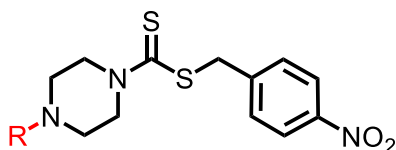
### 3.5.2 Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivate am Piperazin-Teilgerüst

Nachfolgend werden nun die einzelnen Derivate vorgestellt, die bezüglich ihrer Substituenten in Gruppen zusammengefasst wurden. Auch werden die jeweils für die Synthese genutzten Reaktionspfade angegeben.

### 3.5.2.1 Alkyl- bzw. Cycloalkyl-Substituenten

Erste Harnstoff-Derivate besaßen einen Alkyl-Rest und waren mono-substituiert (**Tab. 29**).

**Tabelle 29:** Strukturformeln und Ausbeuten der Piperazin-(Thio)-Harnstoffderivate mit unterschiedlichen Alkyl- bzw. Cycloalkyl-Substituenten (Ausbeuten über mehrere Stufen berechnet, ausgenommen sind die über die Route B erhaltenen Derivate)



R =	Route	Ausbeute [%]	R =	Route	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.203</b>	C	22	 <b>Schl-33.732</b>	B	33
 <b>Schl-33.309</b>	C	56	 <b>Schl-33.201</b>	A	29
 <b>Schl-33.326</b>	C	48	 <b>Schl-33.724</b>	B	50
 <b>Schl-33.262</b>	C	68	 <b>Schl-33.275</b>	B	58
 <b>Schl-33.261</b>	C	42	 <b>Schl-33.304</b>	B	95

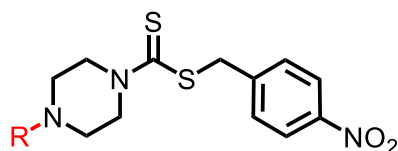
Neben Derivaten mit unterschiedlich langen Alkylketten, angefangen beim Ethyl- (**Schl-33.203**) über Propyl- (**Schl-33.309**) und Butyl- (**Schl-33.326**) bis hin zum Hexyl-Rest (**Schl-33.262**), wurden auch solche mit unterschiedlich großen Ringen dargestellt. Hierzu zählen ein Cyclopropylmethyl- (**Schl-33.261**), Cyclopentyl- (**Schl-33.732**) und Cyclohexyl-Derivat (**Schl-33.201**). Nicht nur Harnstoff-Derivate, sondern auch Thioharnstoff-Derivate mit Alkylsubstituent wurden hergestellt, wie zum Beispiel ein Methyl- (**Schl-33.724**) und ein Isopropyl-Derivat (**Schl-33.275**), aber auch ein ungesättigtes System mit Allyl-

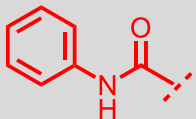
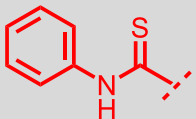
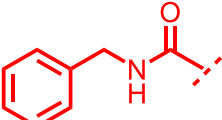
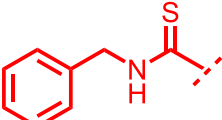
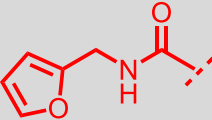
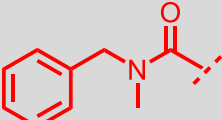
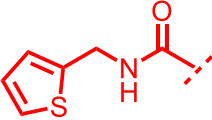
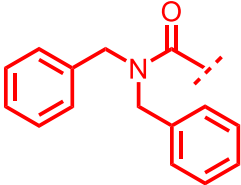
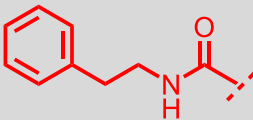
Rest (**Schl-33.304**). Besonders enttäuschend war, dass die aufwendige Synthese bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  jedoch zu keinem *in vitro* aktiven Alkyl-substituierten Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivat führte. Lediglich das Methyl-Thioharnstoffderivat hatte nach 72 h einen schwachen Effekt auf die Paarungsstabilität.

### 3.5.2.2 Aryl- und Arylalkyl-Substituenten

Zusätzlich zu den Harnstoffen mit Alkyl-Rest wurden auch solche mit Aryl- oder Arylalkyl-Rest dargestellt (**Tab. 30**).

**Tabelle 30:** Strukturformeln und Ausbeuten der Piperazin-(Thio)-Harnstoffderivate mit unterschiedlichen Aryl- und Arylalkyl-Substituenten (Ausbeuten allesamt über mehrere Stufen berechnet)



R =	Route	Ausbeute [%]	R =	Route	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.192</b>	A	15	 <b>Schl-33.193</b>	A	70
 <b>Schl-33.205</b>	A	25	 <b>Schl-33.250</b>	A	45
 <b>Schl-33.721</b>	C	12	 <b>Schl-33.242</b>	D	47
 <b>Schl-33.723</b>	C	29	 <b>Schl-33.272</b>	D	24
 <b>Schl-33.249</b>	A	31			



Der Benzyl-Harnstoff (**Schl-33.205**) war das erste Harnstoff-Derivat, das antischistosomal wirkte. Nach 72 h hatte es zu einer 40%-igen Reduktion der Motilität geführt (**Abb. 125**). Darüber hinaus nahm es einen gewissen Einfluss auf die Paarungsstabilität und führte so über 72 h zur Entpaarung von mehr als 50% der Würmer. Verbunden war dies mit einer verminderten Produktion an Eiern. Diese betrug innerhalb der letzten 24 h der Beobachtung etwa 80 Eier (**Abb. 126**). Außerdem traten zumeist schwache Darmdilatationen auf, die bereits nach 48 h wahrzunehmen waren und vereinzelt beide Geschlechter betrafen. Unterhalb von 10  $\mu\text{M}$ , genauer bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  war das Benzyl-Harnstoff-Derivat **Schl-33.205** dann inaktiv.

Die Aktivität des Benzyl-Harnstoff-Derivats wurde zum Anlass genommen, weitere Harnstoff-Derivate mit aromatischem Rest zu synthetisieren. Angefangen wurde mit der Verkürzung sowie der Verlängerung des Linkers durch das Entfernen oder Ergänzen einer Methyleinheit zwischen dem Phenyl-Rest und der NH-Gruppe des Harnstoffs. So entstanden ein Phenyl- (**Schl-33.192**) und ein Phenethyl-Harnstoff-Derivat (**Schl-33.249**), die *in vitro* aber unwirksam waren. Ein anneliertes Phenyl-Harnstoffderivat aus 2-Naphthyl-isocyanat war unlöslich und konnte aus diesem Grund nicht getestet werden.

Damit war die Kettenlänge des Linkers auf eine Methylen-Gruppe festgelegt und der Benzol-Ring wurde durch ein Thiophen-Bioisoster (**Schl-33.723**) ausgetauscht. Im Zuge der Ring-zu-Ring-Transformation wurde der 5-Ring-Heteroaromat Thiophen dann wiederum durch einen Furan-Ring ersetzt, das Schwefelatom also gegen ein Sauerstoffatom ausgetauscht (**Schl-33.721**). Die physikochemische Ähnlichkeit mit dem Benzol-Ring ist hier weniger groß. *In vitro* war das Thiophen-Derivat nicht aktiv, das Furan-Derivat zeigte aber bezüglich der Paarungsstabilität nach 72 h einen schwachen Effekt. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der Austausch des Benzol-Rings wenig erfolgreich hinsichtlich eines Aktivitätsgewinns war.

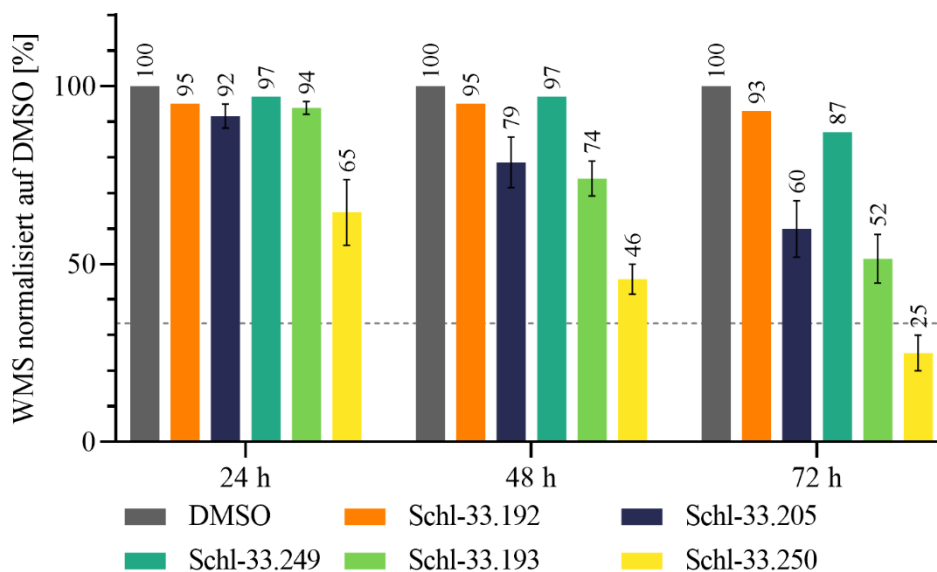
Im nächsten Schritt galt es zu klären, inwieweit mit einem disubstituierten Piperazin-Harnstoffderivat mit einem Benzylsubstituenten als feststehendem Rest ein Aktivitätsgewinn verbunden ist. Es galt also zu prüfen, ob die NH-Gruppe für eine antischistosomale Wirkung unbedingt erforderlich ist. Dazu wurde das Benzylharnstoff-Derivat mit Benzylbromid bzw. Methyljodid alkyliert und so neben einem symmetrisch substituierten, ein unsymmetrisch substituiertes Derivat (**Schl-33.272** und **Schl-33.242**) hergestellt. Diese waren *in vitro* jedoch nicht aktiv.

Der Vollständigkeit halber wurde letztendlich die Carbonylgruppe durch eine Thiocarbonylgruppe ersetzt, womit sich anstelle des Benzyl-Harnstoff-Derivats **Schl-33.205**

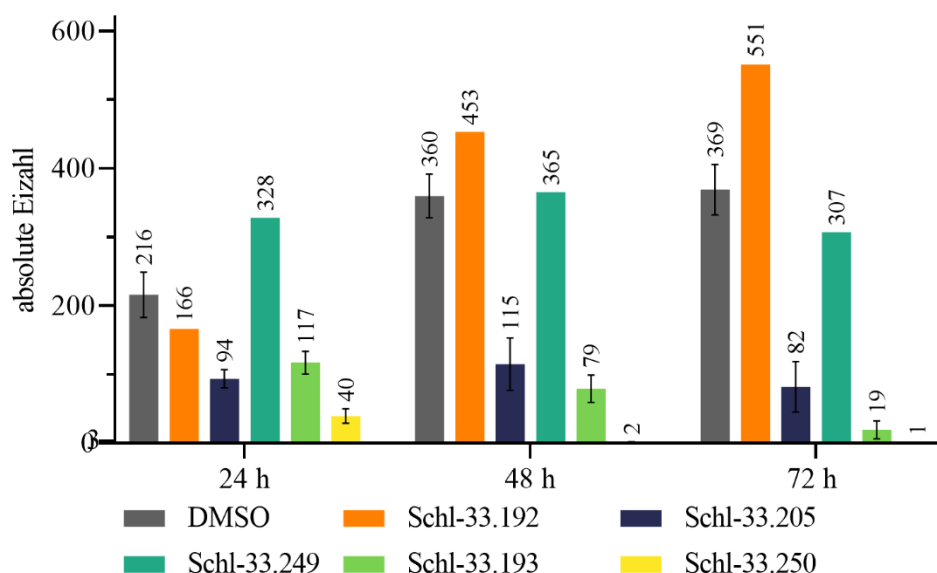
ein Benzyl-Thioharnstoff-Derivat (**Schl-33.250**) ergab. Dieses erwies sich gegenüber den Schistsomen aktiver als das Harnstoffanalogon. Bereits nach 24 h führte es zu einer bis zu 35%-igen Inhibition der Wurmmotilität. Nach insgesamt 48 h war diese dann um bis zu 55% reduziert und nach 72 h wurden auch letale Effekte sichtbar (**Abb. 125**). Zudem waren nach 48 h alle Würmer entpaart, womit die Eizahl auf annähernd 0 sank (**Abb. 126**). Schon innerhalb der ersten 24 h war die Eiproduktion überaus deutlich von einer Wirkung des Thioharnstoffs betroffen. Gerade einmal 40 Eier traten in diesem Zeitraum auf. Die Wirksamkeit wurde durch das Auftreten von Phänotypen begleitet. So waren erste Darmdilatationen beider Geschlechter nach 24 h wahrzunehmen, die mit der Zeit an Intensität zunahmen und nach 72 h dann von besonderer Schwere waren. Etwas abgeschwächt traten nach 48 h auch Tegumentschäden zu Tage. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  war die Ergebnislage weniger eindeutig. Zumeist konnten hier über 72 h jedenfalls vereinzelt schwache Darmdilatationen an den Weibchen wahrgenommen werden. Uneinheitlich waren aber die Effekte auf die Eiproduktion, das Paarungsverhalten und die Motilität. Das eine Mal wurden jene Parameter durchaus signifikant beeinflusst, wohingegen ein anderes Mal keinerlei Abweichungen gegenüber der Negativkontrolle auftraten. Über die Anzahl von acht Testungen nivellierten sich die Unterschiede, sodass in Summe eher von einer Unwirksamkeit des Benzyl-Thioharnstoff-Derivats unterhalb einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ausgegangen werden kann.

Da das Thioharnstoff-Derivat **Schl-33.250** aktiver als das entsprechende Harnstoff-Derivat **Schl-33.205** war, wurde für das Benzyl-Derivat eine Verkürzung des Linkers vorgenommen. Das resultierende Phenyl-Thioharnstoff-Derivat **Schl-33.193** war gleichwohl aktiv. Nach 48 h war die Motilität um 25% und nach 72 h um 50% zurückgegangen. Die Eiproduktion nahm nach 48 h einen Wert an, der mit dem des Benzylharnstoffs (**Schl-33.205**) nach 72 h vergleichbar war. Dieser sank für das Phenyl-Thioharnstoff-Derivat nach 72 h auf einen absoluten Wert von etwa 20. Die Paarungsstabilität war nach 72 h ebenso betroffen. Vereinzelt traten nach 72 schwache Tegumentschäden an Weibchen und Männchen auf. Mittelstarke Darmdilatationen waren nach 48 h sichtbar und hauptsächlich auf die Weibchen beschränkt. Das Phenyl-Thioharnstoff-Derivat **Schl-33.193** war schwächer wirksam als das Benzyl-Thioharnstoff-Derivat **Schl-33.250**. Dieser Umstand ist möglicherweise auf die verminderte Anzahl an Freiheitsgraden des Phenyl-Derivats zurückzuführen durch den Verlust der Drehbarkeit um die zusätzliche Methyleninheit, wodurch der Benzol-Ring gegenüber einem weiteren  $\pi$ -System günstiger angeordnet ist; oder aber auf den dadurch verminderten Abstand zu einem solchen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Thioharnstoff-Derivate mit aromatischer Teilstruktur aktiver sind als die analogen Harnstoff-Derivate. Weitere

Möglichkeiten zur Optimierung der Phenyl-/Benzyl-Thioharnstoff-Derivate bieten beispielsweise die Substitution des Aromaten mit elektronenziehenden/-schiebenden Gruppen oder der Austausch des Benzol-Rings durch einen Pyridin-Ring.



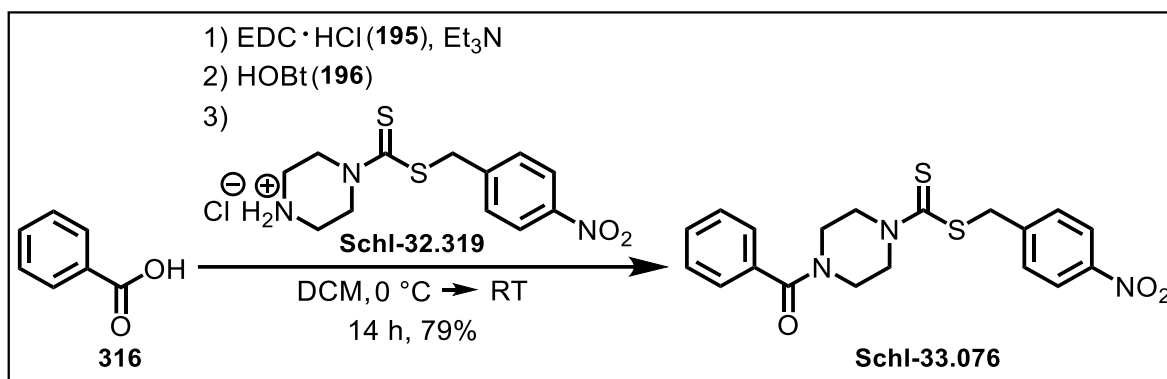
**Abbildung 125:** WMS der (Thio)-Harnstoff-Derivate mit Phenyl-, Benzyl- und Phenethyl-Rest nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu\text{M}$



**Abbildung 126:** Absolute Eizahlen der (Thio)-Harnstoff-Derivate mit Phenyl-, Benzyl- und Phenethyl-Rest nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu\text{M}$

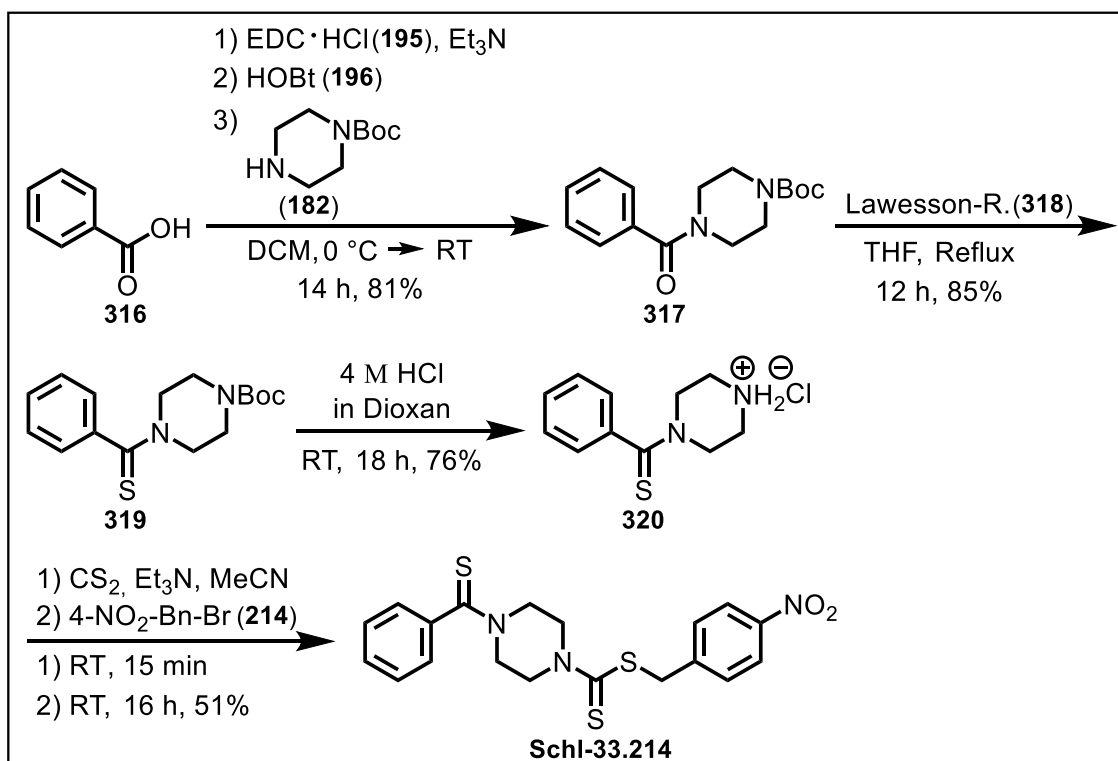
### 3.5.2.3 Vergleich von Harnstoff- und Carbonsäureamid-Derivaten

Zum direkten Vergleich wurden neben den Phenyl-(Thio)-Harnstoff-Derivaten auch das entsprechende Carbonsäureamid **Schl-33.076** und das Carbonsäurethioamid **Schl-33.214** dargestellt und einer *in-vitro*-Testung unterzogen. Für die Synthese des Ersten wurde dazu Benzoesäure (**316**) mit Piperazin-Hydrochlorid **Schl-32.319** in einer EDC-Kupplung zur Reaktion gebracht (Schema 60).



**Schema 60:** Synthese zur Darstellung des Carbonsäureamids **Schl-33.076** ausgehend von Benzoesäure

Die Synthese des Carbonsäurethioamids **Schl-33.214** begann mit der EDC-Kupplung von Benzoesäure (**316**) und Boc-Piperazin (**182**). Das resultierende Zwischenprodukt **317** wurde in einer Thionierungsreaktion mit dem *Lawessons*-Reagenz (**318**) nach Optimierung der Reaktionsbedingungen schließlich unter Rückfluss in das Thioamid **319** überführt. Ein vorheriger Reaktionsansatz, bei dem **Schl-33.076** direkt mit dem *Lawessons*-Reagenz umgesetzt wurde, war noch gescheitert. Die Thionierung des Carbamats zum Thionocarbamat blieb bei der Reaktionsführung aus. Das Boc-geschützte Thioamid **319** konnte im Säuren problemlos entschützt und letztlich in das Dithiocarbamat **Schl-33.214** überführt werden (**Schema 61**).

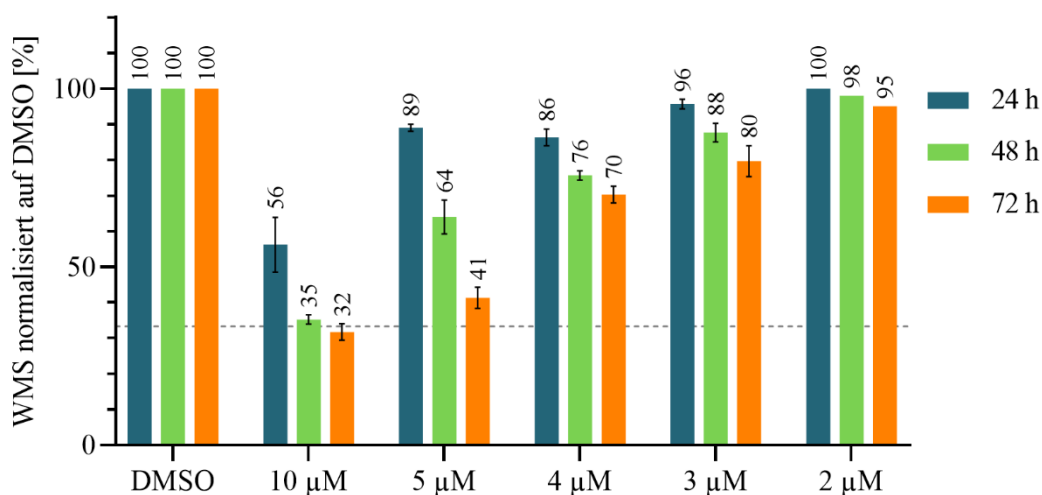


**Schema 61:** Synthesesequenz zur Darstellung des Carbonsäurethioamids **Schl-33.214** ausgehend von Benzoesäure

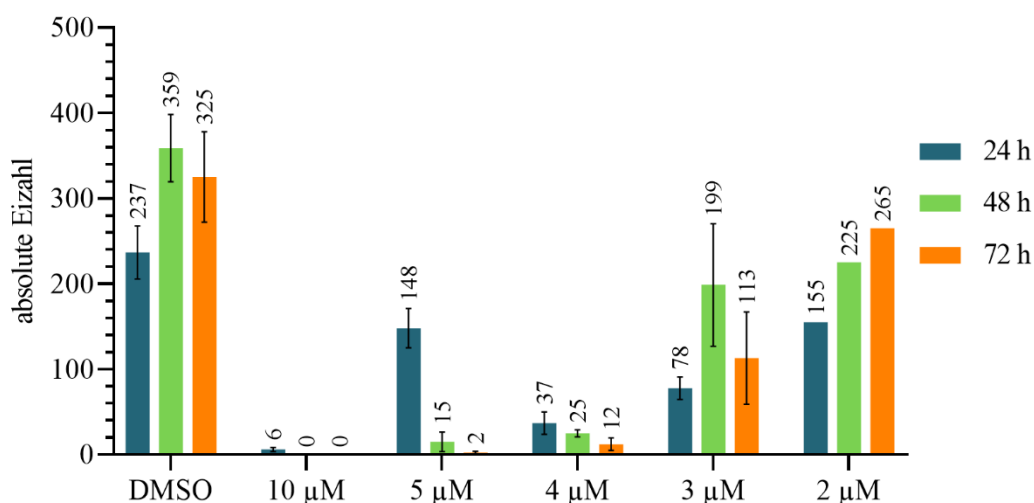
Beide Carbonsäureamid-Derivate zeigten aber bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine antischistosomale Aktivität; ein Austausch insbesondere des Phenyl-Thioharnstoff-Teilgerüsts gegen die Phenyl-Thioamid-Struktur wurde also nicht toleriert. Dieser Umstand ist möglicherweise auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass das Phenyl-Thioamid-Derivat gegenüber dem Phenyl-Thioharnstoff-Derivat um ein Atom verkürzt ist und damit auch eine andere Geometrie aufweist. Die Darstellung eines Phenyllessigsäure-Derivats wäre für Folgearbeiten denkbar.

#### 3.5.2.4 Harnstoff-Derivate mit Piperidin-analoger Struktur

Obwohl die NH-Gruppe der Harnstoff-Derivate, wie aus den vorherigen Testungen hervorgeht, für die antischistosomale Aktivität vermeintlich unabdingbar scheint, wurde sie dennoch bewusst durch das Einführen eines Boc-Piperazinyl-Restes aus der Struktur verdrängt. Damit verbunden ist auch der Verlust eines H-Brückendonors. Überdies werden die Verbindungen dadurch weniger polar. Das Bis(piperazinyl)-Harnstoff-Derivat **Schl-33.331 (Tab. 31)** war bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nach 24 h hinsichtlich der Reduktion der Eiproduktion und der Motilität aktiv. Die absoluten Eizahlen lagen unter 10 Stück, die Motilität wurde um etwa 45% reduziert (**Abb. 127+128**). Nach 48 h waren schließlich alle Würmer entpaart, woraufhin keine Eier mehr produziert wurden. Die Motilität sank um weitere 20% und erreichte nach 72 h einen Wert unter 33%, verbunden mit ersten letalen Effekten. Nach 24 h traten erste Darmdilatationen an den Männchen und Weibchen auf, die nach 72 h stark ausgeprägt waren. Dasselbe gilt für Tegumentschäden, die hingegen erst nach 48 h sichtbar wurden. Bei 5  $\mu\text{M}$  gingen die Tegumentschäden verloren. Darmdilatationen waren in ihrer Intensität unverändert, traten aber erst nach 48 h auf. Die Würmer waren nach 72 h alle entpaart, die Eiproduktion indessen mit nur 15 Eiern im Zeitraum von 24-48 h nach 48 h schon deutlich gehemmt. Die Motilität sank innerhalb der ersten 48 h um 35%, in den weiteren 24 h dann nochmals um 25%. Bei 4  $\mu\text{M}$  waren die Darmdilatationen, die nach 48 h erstmals auftraten, nur noch von schwacher bis mittlerer Intensität. Über 72 h sank die Motilität lediglich noch um 30%. Ein starker Effekt auf die Eizahl war allerdings weiterhin zu verzeichnen. Die Eizahlen nahmen nach 24 h Werte unterhalb von 40 an, nach 48 h lagen diese bei etwa 25 und nach 72 h bei weniger als 15. Ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  war kein Effekt auf die Eiproduktion mehr wahrzunehmen, wenngleich nach 72 h etwa die Hälfte aller Würmer entpaart war. Die Motilität sank über 72 h um 20%. Darmdilatationen traten nach 72 h vereinzelt auf und waren schwach ausgeprägt. Unterhalb von 3  $\mu\text{M}$  war das Bispiperazinyl-Harnstoff-Derivat **Schl-33.331** vollständig inaktiv.

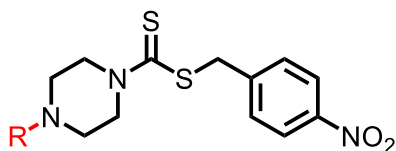


**Abbildung 127:** WMS des mono-Boc-Bispiperazinyl-Harnstoff-Derivats nach 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen



**Abbildung 128:** Absolute Eizahlen des mono-Boc-Bispiperazinyl-Harnstoff-Derivats nach 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen

Das Boc-Piperazin-Harnstoff-Derivat **Schl-33.331** wurde auf Grund seiner guten antischistosomalen Aktivität als Ausgangspunkt für weitere Strukturvariationen gewählt (**Tab. 31**). Angefangen wurde mit dem Ersatz des Stickstoff-Atoms im Piperazin-Ring an Position 4 durch ein Sauerstoffatom (**Schl-33.316**) bzw. Schwefelatom (**Schl-33.314**) und somit dem Ersatz des Piperazins durch einen Morpholin- bzw. Thiomorpholin-Heterozyklus. Ein Piperidin-Ring (**Schl-33.315**) und dessen Oxidationsprodukt 4-Hydroxy-Piperidin (**Schl-33.427**) komplettierten den Satz an Testverbindungen, die jedoch alle effektfrei blieben. Dies trifft auch auf ein 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-Derivat (**Schl-33.725**) zu. Durch Boc-Entschützung des Boc-Piperazin-Harnstoff-Derivats **Schl-33.331** wurde das Hydrochlorid **Schl-33.346** erhalten, das *in vitro* nach 48 h zwar vereinzelt zu schwachen Darmdilataationen der Männchen führte, ansonsten aber wirkungslos war.

**Tabelle 31:** Strukturformeln und Ausbeuten der Harnstoffderivate mit variiertem Piperidin-analogen-Strukturelement (Ausbeuten allesamt über mehrere Stufen berechnet)


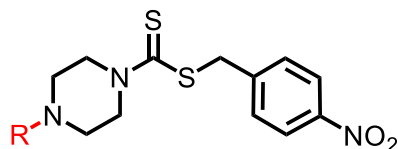
R =	Route	Ausbeute [%]	R =	Route	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.315</b>	C	53	 <b>Schl-33.331</b>	C mit <b>Schl-32.319</b>	73
 <b>Schl-33.427</b>	C	58	 <b>Schl-33.346</b>	Boc-Spaltung	33
 <b>Schl-33.316</b>	C	34	 <b>Schl-33.725</b>	C	50
 <b>Schl-33.314</b>	C	58			

### 3.5.2.5 N-substituierte Bis(piperaziny)-Harnstoff-Derivate

Das Stickstoffatom in 4-Position des Piperazin-Rings bot nun einen weiteren Ansatz für eine eventuelle Verbesserungen der antischistosomalen Aktivität. Zunächst wurde dieses durch Alkylierung in ein tertiäres Amin überführt. Unter Aufrechterhaltung des basischen Charakters wurde der Stickstoff mit einem Ethyl-Rest (**Schl-33.773**) bzw. *para*-Methylbenzyl-Rest (**Schl-33.777**) substituiert (**Tab. 32**). Während das Ethyl-Derivat **Schl-33.773** schwach auf die Paarungsstabilität wirkte, führte das *para*-Methylbenzyl-Derivat **Schl-33.777** zu einem Rückgang der Motilität von etwa 25%. Ferner entstanden ein Hydroxyethanol- (**Schl-33.422**) und ein *N*-Isopropyl-2-piperazin-1-yl-acetamid-Derivat (**Schl-33.416**) sowie durch Acylierung ein *N*-Acetylpiperazin- (**Schl-33.424**), ein Cyclopropyl- (**Schl-33.355**) und ein Furoyl-Derivat (**Schl-33.410**). Abgerundet wurde die Substitution des Stickstoffatoms der Piperazin-Harnstoffderivate durch Sulfonylierung und Sulfamoylierung und damit der Synthese des

Sulfonamids **Schl-33.330** und des Schwefelsäurediamids **Schl-33.776**. Alle Derivate entstanden dabei über die Route C. Die Substitution des Piperazins erfolgte bevor dieses zum Harnstoff abreagierte. Die *N*-Substitution führte zu insgesamt annähernd wirkungslosen Verbindungen.

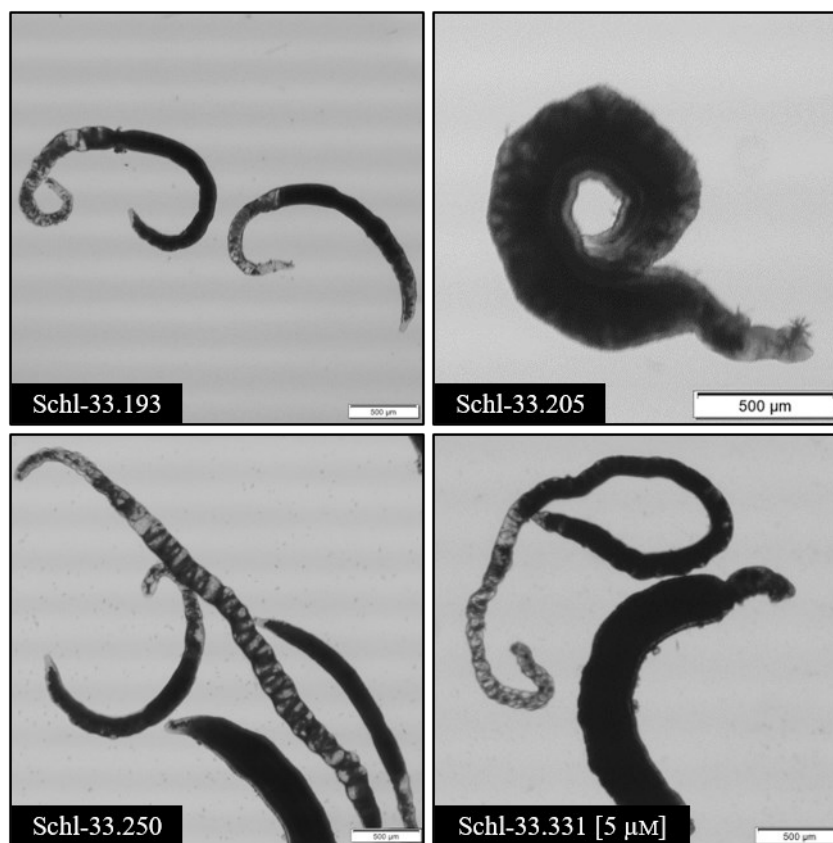
**Tabelle 32:** Strukturformeln und Ausbeuten *N*-substituierter Bis(piperazinyl)-Harnstoff-Derivate (Ausbeuten allesamt über mehrere Stufen berechnet)



R =	Ausbeute [%]	R =	Ausbeute [%]
 Schl-33.773	40	 Schl-33.424	32
 Schl-33.777	73	 Schl-33.355	19
 Schl-33.422	24	 Schl-33.410	59
 Schl-33.416	51	 Schl-33.330	22
		 Schl-33.776	23

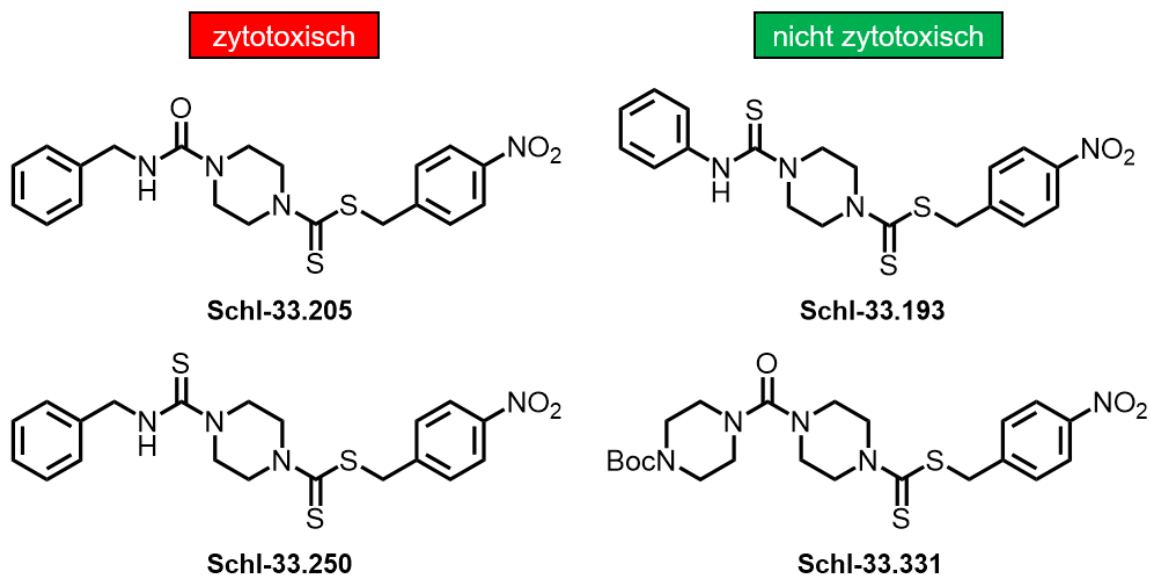


Nachfolgend (**Abb. 129**) werden beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen der unter Behandlungen mit den dargestellten Harnstoff-/Thioharnstoff-Derivaten aufgetretenen Phänotypen gezeigt.



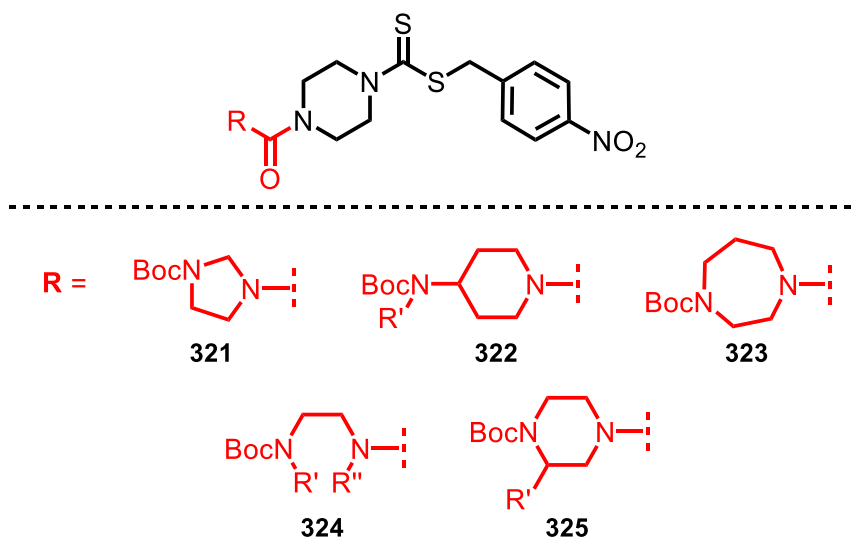
**Abbildung 129:** Exemplarische Phänotypen der Thioharnstoff-/Harnstoff-Derivate bei 5 µM bzw. 10 µM nach 72 h; **Schl-33.193:** brezel-/hakenförmig angeordnete Weibchen mit Darmdilataationen mittlerer Intensität; **Schl-33.250:** ein Weibchen mit schwersten Darmdilataationen (den gesamten Verdauungstrakt betreffend); **Schl-33.205:** reifenförmig aufgerolltes Männchen mit Darmdilataationen und nadelförmigen Anhaftungen; **Schl-33.331:** Weibchen mit Darmdilataationen (lokal begrenzt, distales Ende ausgespart) und ödematös aufgequollenes Männchen mit Tegumentbläschen

Von den aktiven Harnstoff- und Thioharnstoff-Derivaten war das Thiophenyl-Derivat **Schl-33.193** bis zu einer Konzentration von 50 µM nicht zytotoxisch gegenüber der HepG2-Zelllinie, das Thiobenzyl-Derivat **Schl-33.250** hingegen gegenüber der LS174T-Zelllinie (**Abb.130**). Bei 25 µM zeigte es indessen bereits eine toxische Wirkung auf HepG2-Zellen. Das Boc-Piperazinyl-Derivat **Schl-33.331** wiederum war gegenüber beiden Zelllinien bei 50 µM unauffällig. Bei 100 µM zeigte dann auch das Benzyl-Derivat **Schl-33.205** zellschädigende Wirkung hinsichtlich der HepG2-Zelllinie. Damit waren die Thio-Harnstoff-Derivate im Allgemeinen antsichistosomal aktiver als die Harnstoff-Derivate, jedoch auch stärker zytotoxisch.



**Abbildung 130:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.205** bei 100  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.250** bei 25  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie sowie von **Schl-33.193/331** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie (**Schl-33.331** zusätzlich auch nicht zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber LS174T-Zelllinie)

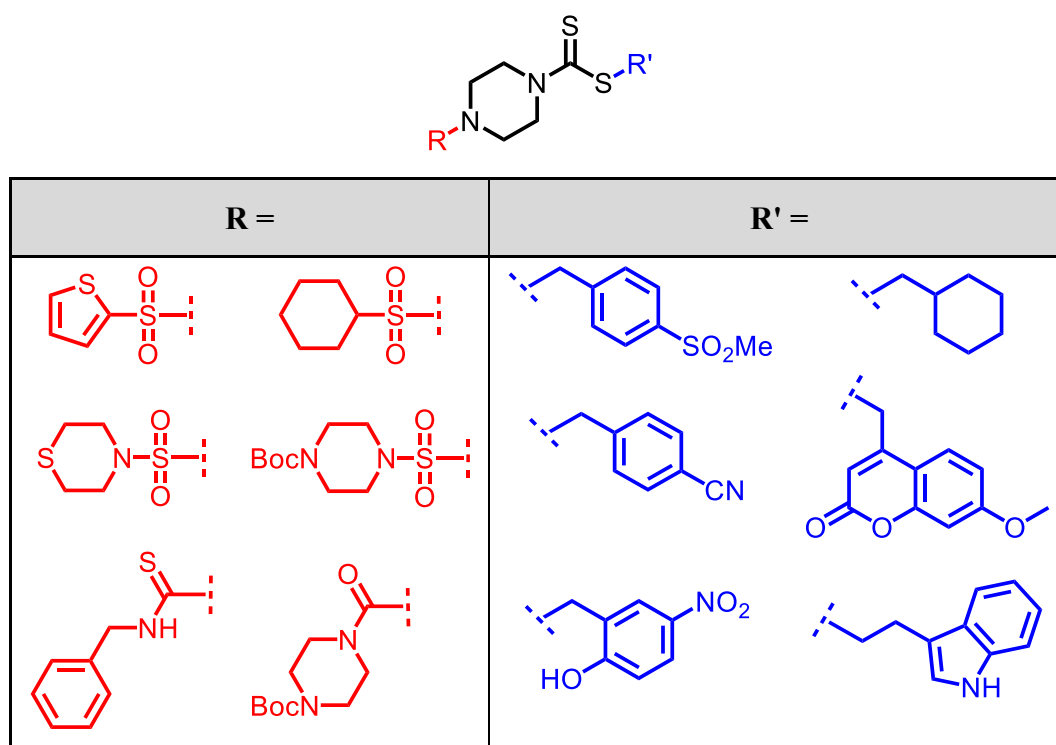
Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung des mono-Boc-Piperazin-Harnstoff-Derivats **Schl-33.331** bietet die Änderung der Ringgröße (**Abb. 131**). So lassen sich ein Boc-Imidazolidin- (**321**) oder Boc-Homopiperazin-Derivat (**323**) darstellen. Auch ist ein 4-*N*-Boc-Aminopiperidin-Derivat (**322**) und damit das Verlegen des Stickstoffatoms an die Außenseite des 6-Rings denkbar. Gleiches gilt für ein *tert*-Butyl-*N*-(2-aminoethyl)carbammat-Derivat (**324**), das ein „aufgeschnittenes“ Piperazin-Derivat imitiert, oder die Substitution des Piperazin-Rings in 2- beziehungsweise 3-Position (**325**).



**Abbildung 131:** Weitere Möglichkeiten zur Optimierung des mono-Boc-Bispiperazinylderivats **Schl-33.331**

### 3.6 Kombinationsserie 2

Nach Abschluss der Optimierungen auf Seiten des endständigen Piperazin-Stickstoffatoms durch die Darstellung von Sulfonamiden, Schwefelsäurediamiden und Harnstoffen wurden die sechs wirksamsten Substituenten R wiederum mit den sechs wirksamsten Substituenten R' am einfach gebundenen Schwefelatom des Dithiocarbamats, welche aus der Arbeit von P. MÄDER hervorgingen, kombiniert.<sup>[286]</sup> Insbesondere handelt es sich bei dem Substituenten R' am einfach gebundene Schwefelatom um einen 4-(Methylsulfonyl)benzyl-, 4-Cyanbenzyl-, 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-, Cyclohexylmethyl-, (7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl- und einen 2-(1H-Indol-3-yl)ethyl-Rest. Bei den Resten R am Stickstoffatom in 4-Position des Piperazins wurden aus jeder der bearbeiteten Substanzklassen zwei Reste ausgewählt. Aus der Substanzklasse der Sulfonamide wurden ein 2-Thiophensulfonyl- und ein Cyclohexylsulfonyl-Rest ausgewählt. Aus der Substanzklasse der Schwefelsäurediamide stammten ein Boc-(piperazin-1-yl)sulfonyl- und ein 4-(Thiomorpholino)sulfonyl-Rest. Die Harnstoffe steuerten einen 4-Benzylcarbamothioyl- und einen Boc-(piperazin-1-carbonyl)-Rest zu der Kombinationsserie 2 bei (**Abb. 132**). Insgesamt wurden also sechsunddreißig neuartige Verbindungen synthetisiert und *in vitro* getestet.



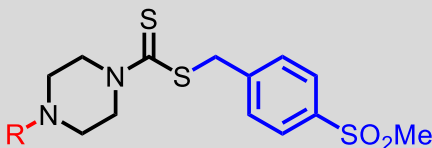
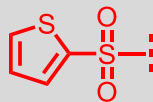
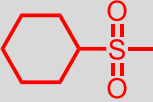
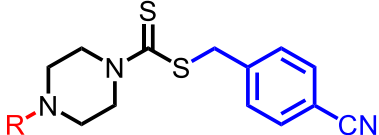
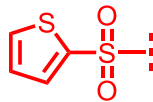
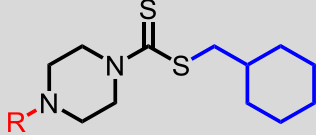
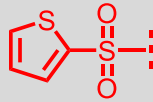
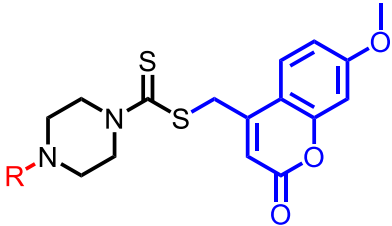
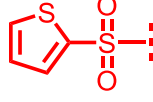
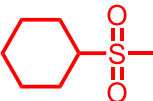
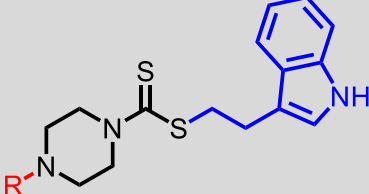
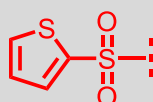
**Abbildung 132:** Übersicht der für die finale Kombination ausgewählten Substituenten auf Seiten des Schwefels sowie des Stickstoffs nach vorausgegangener Optimierung der Dithiocarbamat-Derivate durch Darstellung von neuartigen Sulfonamiden, Schwefelsäurediamiden und Harnstoffen

### Dithiocarbamate mit Sulfonamid-Teilstruktur

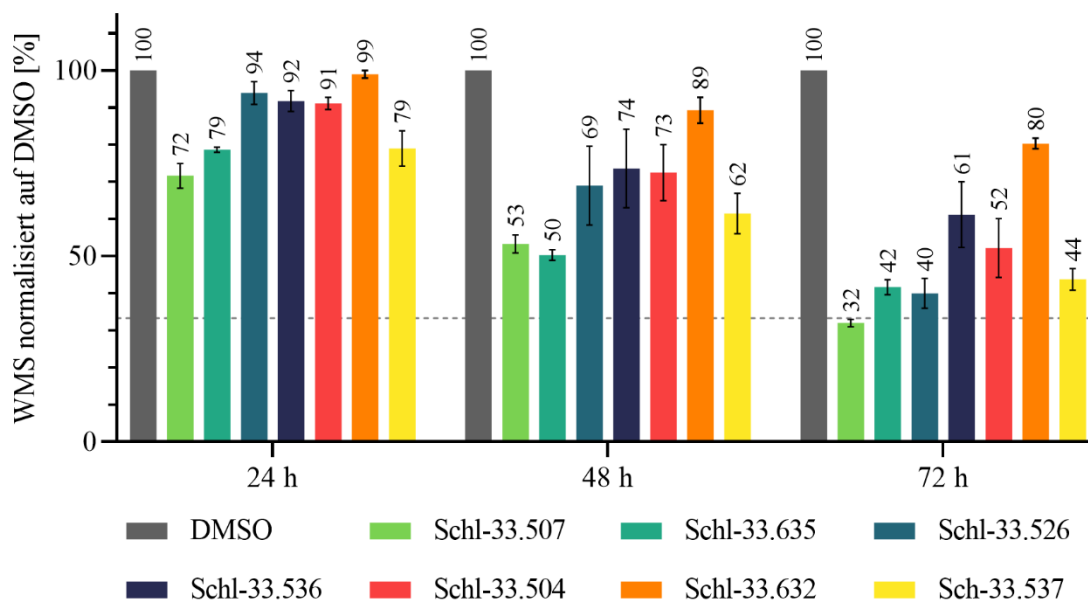
Die Synthese der Sulfonamide nutzte dabei die in der Kombinationsserie 1 bereits vorgestellten Methoden, wonach der Aufbau der Dithiocarbamatfunktion sowohl vor als auch nach der Kondensation mit dem Sulfonylchlorid erfolgte (**Schema 26+27**, S. 68+71). Letztgenannte Synthesefolge, die zuvor ausschließlich auf das 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid beschränkt war, wurde hier auch für andere Benzylbromide genutzt.

In der Gruppe der Sulfonamid-Derivate zeigten insgesamt sieben Verbindungen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine antischistosomale Aktivität. Der 2-Thiophenyl-Rest führte dabei mit Ausnahme des 2-Hydroxy-5-nitrobenzylrestes zu ausschließlich aktiven Verbindungen. Der Cyclohexyl-Rest hingegen war nur in Kombination mit dem 4-(Methylsulfonyl)benzyl- oder dem (7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl-Rest aktiv (**Tab. 33**).

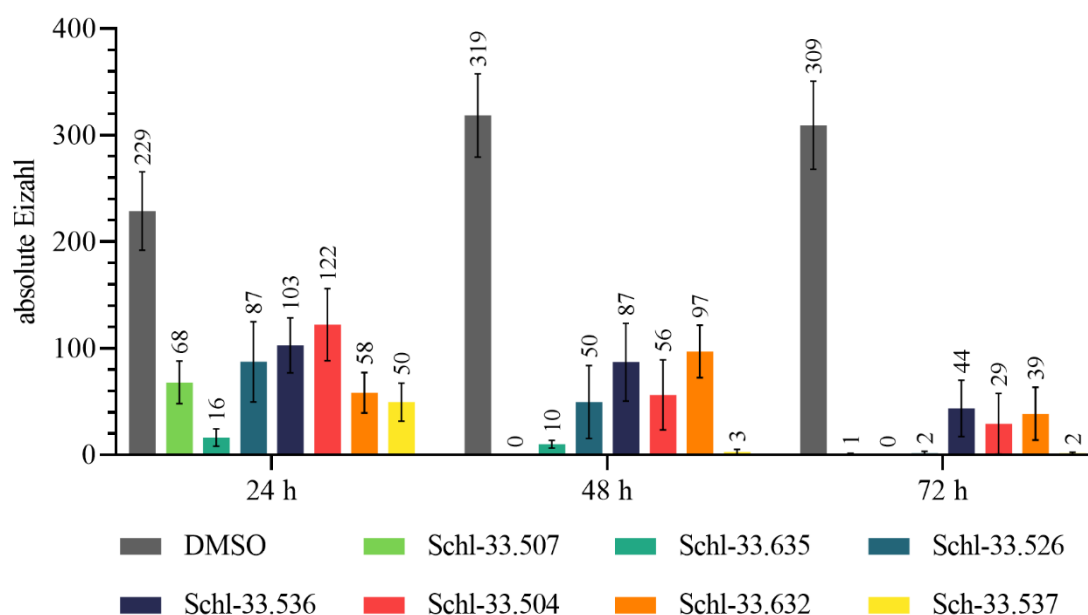
**Tabelle 33:** Gerankte Strukturen der aktiven Dithiocarbamat-Derivate mit Sulfonamid-Teilstruktur bezüglich der antischistosomalen Aktivität (1 = am aktivsten; 7 = am wenigsten aktiv)

Strukturformel	Schl-33.	R =	Ranking
	...507		1
	...635		2
	...526		5
	...536		6
	...504		3
	...632		7
	...537		4

Das Sulfonamid **Schl-33.632** mit Cyclohexyl- und (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest war das am schwächsten wirksame Sulfonamid. Signifikant hatte es nur auf die Eiproduktion Einfluss (**Abb. 134**). Nach 72 h wurden noch etwa 40 Eier gelegt. Zudem führte es vereinzelt zu schwachen Darmdilatationen. **Schl-33.536** mit einem 2-Thiophenyl- und Cyclohexylmethyl-Rest hingegen war etwas aktiver. Es reduzierte die Eiproduktion in gleicher Weise. Zusätzlich verursachte es jedoch auch eine 80%-ige Entpaarung und etwa 40%-ige Reduktion der Motilität (**Abb. 133**). Darmdilatationen, die nach etwa 24 h sichtbar wurden, waren mittelstarker bis starker Intensität. Hinsichtlich der Wirksamkeit folgen das 4-Cyanbenzyl- (**Schl-33.526**) und das 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Derivat **Schl-33.537**. Bei beiden wurde eine vollständige Entpaarung aller Schistosomenpärchen über 72 h sowie eine etwa 100%-ige Inhibition der Eiproduktion und 60%-ige Reduktion der Motilität beobachtet. **Schl-33.537** wirkte (alle Parameter betreffend) jedoch etwas früher. Starke Darmdilatationen standen starke Tegumentschäden gegenüber. Unterhalb von 10 µM waren beide Verbindungen inaktiv. Wird der 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest gegen einen (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest ausgetauscht, ergibt sich **Schl-33.504**. Dies hatte zwar einen um 40% schwächeren Effekt auf die Paarungsstabilität sowie einen etwa 10% schwächeren Effekt auf die Reduktion der Motilität, führte aber bis zu einer Konzentration von 5 µM zu starken Darmdilatationen (**Abb. 138**) und einer überaus deutlichen Inhibition der Eiproduktion. Wiederum etwas schwächer in der Ausbildung von Phänotypen war **Schl-33.635** mit einem Cyclohexyl- und 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest, das bis 3 µM vereinzelt schwache Tegumentschäden und bis 2 µM vereinzelt schwache Darmdilatationen verursachte. Bei jener Konzentration führte es außerdem noch zu 80% Entpaarung und einer deutlichen Reduktion der Eizahl auf unter 30 Eier pro 24 h. Eine 50%-ige Inhibition der Motilität wurde bis zu einer Konzentration von 4 µM erreicht. Das aktivste Derivat der Sulfonamide war **Schl-33.507** mit einem 2-Thiophenyl- und einem 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest, das bei 10 µM vereinzelt letal war und sehr starke Darmdilatationen sowie starke Tegumentschäden zeigte. Bis 5 µM ging hier die Motilität um bis zu 50% zurück. Bei 3 µM führte es immer noch zu einer 60%-igen Entpaarung, stark verminderten Eizahlen von weniger als 25 Eiern pro 24 h und nach 48 h zu schwach bis mittelstarken Darmdilatationen.

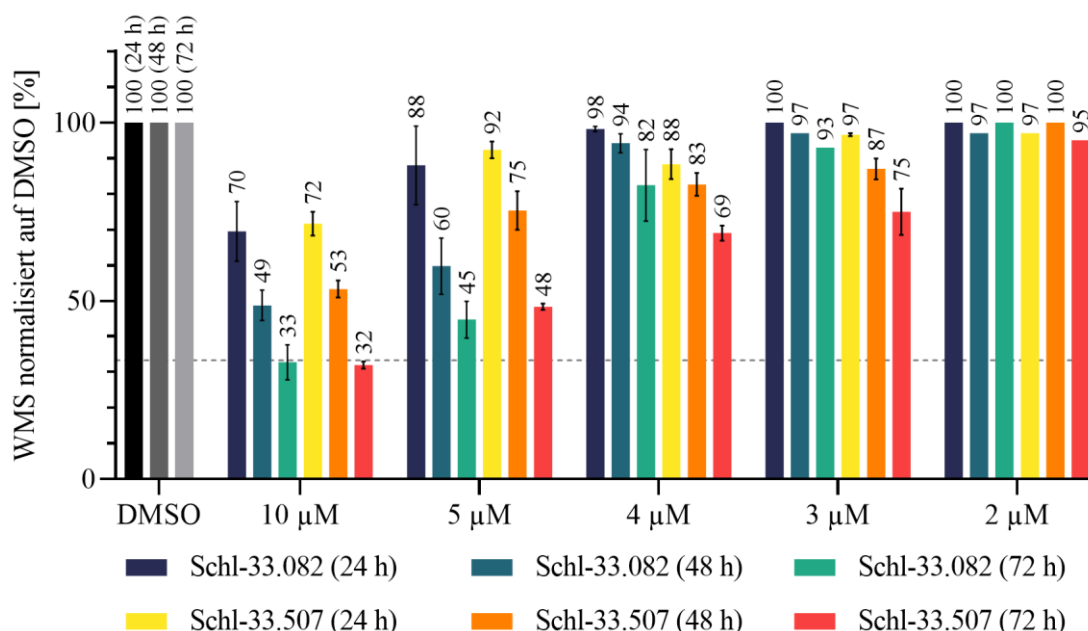


**Abbildung 133:** WMS der Sulfonamid-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich



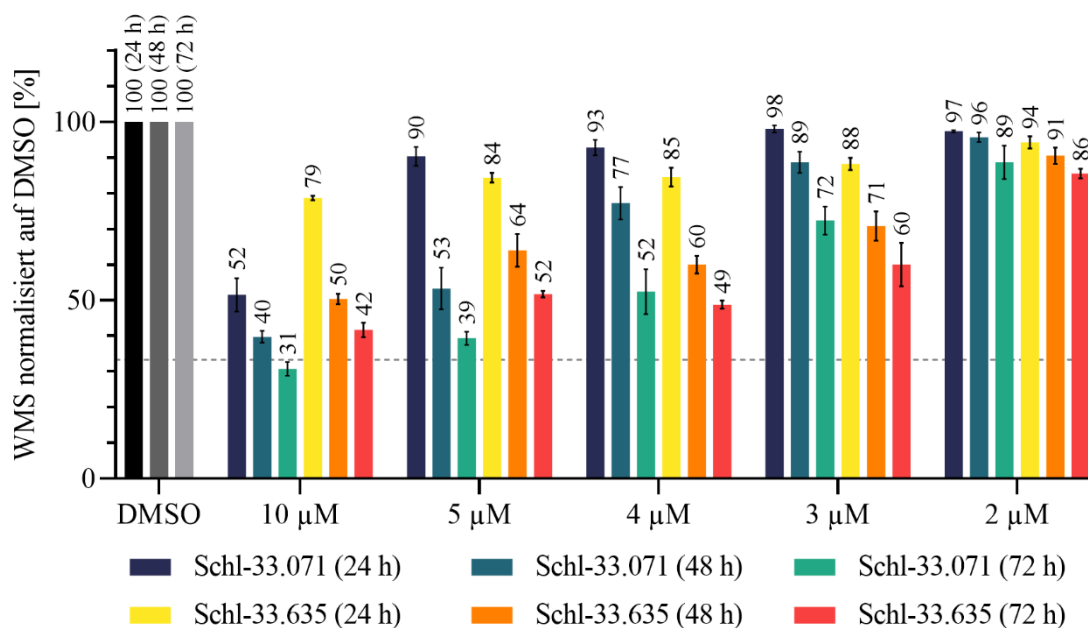
**Abbildung 134:** Absolute Eizahlen der Sulfonamid-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich

Vergleicht man das aktivste Sulfonamid mit 2-Thiophenyl-Rest R und 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest R' (**Schl-33.507**) abschließend mit dem Sulfonamid mit identischem R und einem 4-Nitrobenzyl-Rest R' (**Schl-33.082**), so fällt auf, dass sich beide Derivate bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Während das 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivat etwas früher auf die Eiproduktion Einfluss nimmt, hat es gegenüber dem 4-Nitrobenzyl-Derivat eine verzögerte Wirkung auf die Motilität (**Abb. 135**). Letztgenanntes verursacht zudem stärkere Darmdilatationen. Unterhalb von 5  $\mu\text{M}$  ist das Nitrobenzyl-Derivat aber inaktiv, das 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivat nicht.



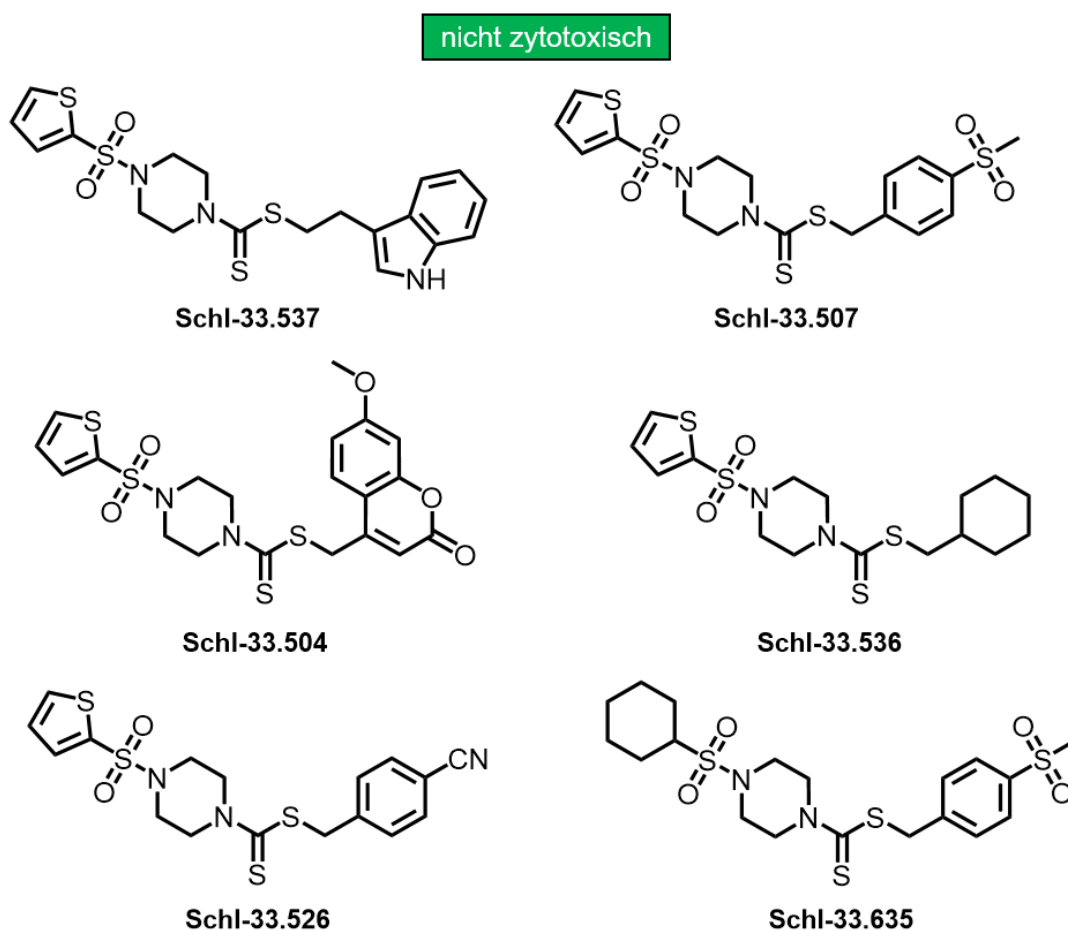
**Abbildung 135:** WMS der Sulfonamid-Derivate **Schl-33.507** und **Schl-33.082** nach 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich

Das aktivste Sulfonamid mit Cyclohexyl-Rest R und 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest R' (**Schl-33.635**) ist gegenüber dem analogen Derivat mit 4-Nitrobenzyl-Rest R' (**Schl-33.071**) bei 4  $\mu$ M über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 h ebenso vergleichbar. Das 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivat wirkt dabei jedoch (alle Parameter betreffend) deutlich früher. Das 4-Nitrobenzyl-Derivat führt demgegenüber aber zu starken, das 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivat eher zu schwachen bis mittelstarken Tegumentschäden. Bei 3  $\mu$ M ist nur noch das 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivat aktiv (**Abb. 136**).



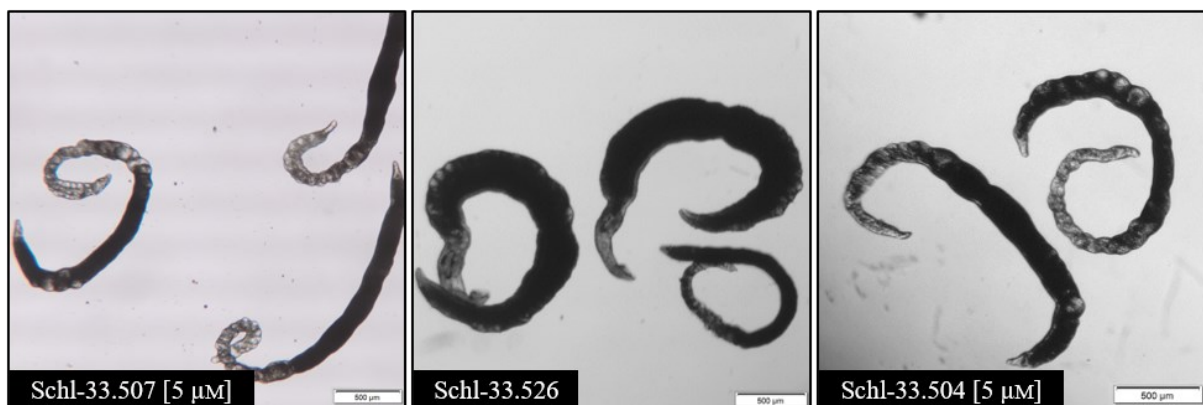
**Abbildung 136:** WMS der Sulfonamid-Derivate **Schl-33.635** und **Schl-33.071** nach 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich

Von den Sulfonamid-Derivaten mit 2-Thiophenyl-Rest waren **Schl-33.537** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest bis 50  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch gegenüber der HepG2- und der LS174T-Zelllinie (**Abb. 137**). **Schl-33.507** mit *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest indessen wirkte auf LS174T-Zellen sogar bis 100  $\mu\text{M}$  nicht toxisch. **Schl-33.504** mit (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest war wiederum nur gegenüber der LS174T-Zelllinie bis 100  $\mu\text{M}$  unauffällig, wohingegen für **Schl-33.536** mit Cyclohexylmethyl-Rest keine Toxizität gegenüber der HepG2-Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Gegenüber beiden Zelllinien unauffällig bei jener Konzentration war **Schl-33.526** mit *para*-Cyanbenzyl-Rest. Als einziges aktives Cyclohexylsulfonyl-Derivat zeigte **Schl-33.635** keine Zytotoxizität bei der Testung mit HepG2-Zellen. Damit waren sechs von sieben Sulfonamiden der Kombinationsserie 2 mindestens bis 50  $\mu\text{M}$  und davon nochmals fünf bis 100  $\mu\text{M}$  zumindest gegenüber einer Zelllinie unauffällig.



**Abbildung 137:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.507/504** bei 100  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.526/537** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie sowie von **Schl-33.536/635** bei 100  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.507/526/537** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie (**Schl-33.504** zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2- und von **Schl-33.536** bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie)

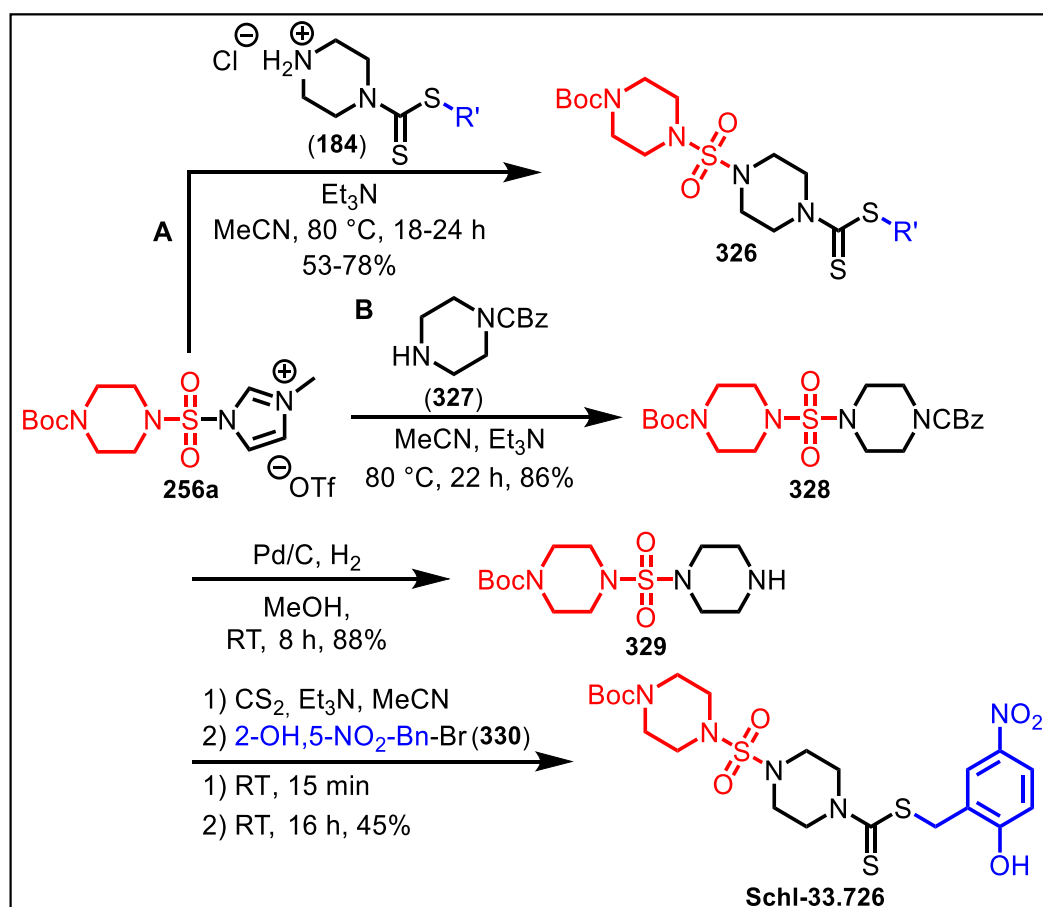




**Abbildung 138:** Exemplarische Phänotypen der Sulfonamid-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 5 bzw. 10 µM nach 72 h; **Schl-33.507/504:** Weibchen mit Darmdilataationen; **Schl-33.526:** zusätzlich ödematös aufgequollene Männchen (eines davon mit Darmdilataationen)

### Dithiocarbamat-Derivate mit Schwefelsäurediamid-Teilstruktur

Die Synthese der Schwefelsäurediamide wurde bereits im Kapitel 3.4 „Schwefelsäurediamide“ abgehandelt. Dabei wurde von 1,1'-Sulfonylbisimidazol ausgegangen. Nach vorherigem Umsatz von Boc-Piperazin mit dem sequenziell aktivierten Bisimidazol wurde, im Falle der Darstellung der 4-(Piperazin-1-ylsulfonyl)thiomorpholin-Derivate, Thiomorpholin als zweites Nucleophil eingesetzt. Für die Synthese der *tert*-Butyl-4-(piperazin-1-ylsulfonyl)piperazin-1-carboxylat-Derivate wurde nach einer leicht abgewandelten Route vorgegangen (**Schema 62**).

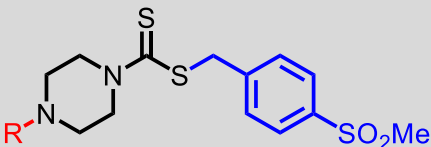
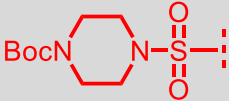
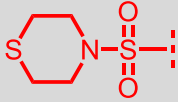
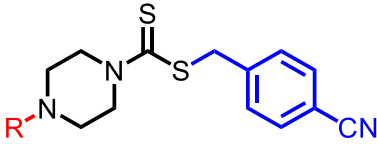
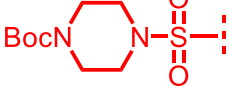
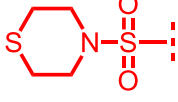
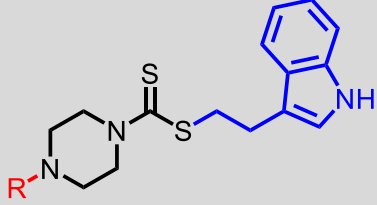
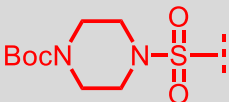
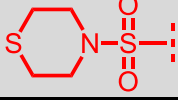


**Schema 62:** Abgewandelte Syntheseroute zur Darstellung der Schwefelsäurediamide der Kombinationsserie 2

Entweder wurde das Imidazoliumsalz **256a** direkt mit den entsprechenden Piperazin-Hydrochloriden **184** zur Reaktion gebracht oder es wurde Piperazinbenzylcarboxylat (**327**) als zweites Nucleophil eingesetzt. Diese Abfolge wurde lediglich zur Darstellung des Schwefelsäurediamid-Derivats **Schl-33.726** mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzylrest gewählt. Die CBz-Schutzgruppe von **328** wurde anschließend hydrogenolytisch unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle gespalten. Das entschützte Piperazin-Stickstoffatom von **329** wurde sodann in der gängigen *one-pot*-Reaktion in die Dithiocarbamatfunktion eingebunden.

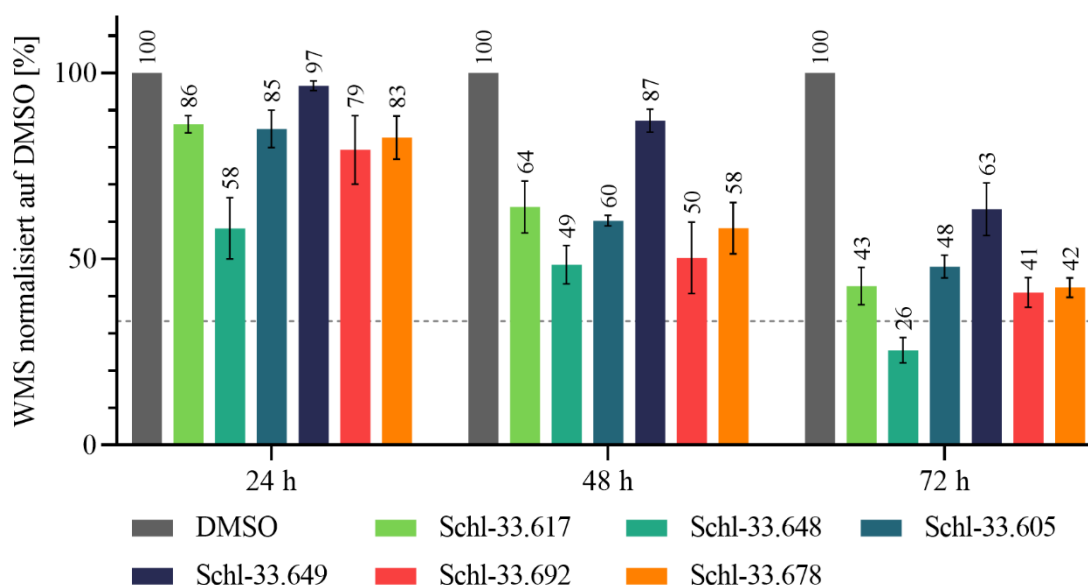
Von den Schwefelsäurediamiden waren die Verbindungen mit einem 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-, einem Cyclohexylmethyl- und einem (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest bei 10  $\mu$ M inaktiv (**Tab. 34**).

**Tabelle 34:** Gerankte Strukturen der aktiven Dithiocarbamat-Derivate mit Schwefelsäurediamid-Teilstruktur bezüglich der antischistosomalen Aktivität (1 = am aktivsten; 6 = am wenigsten aktiv)

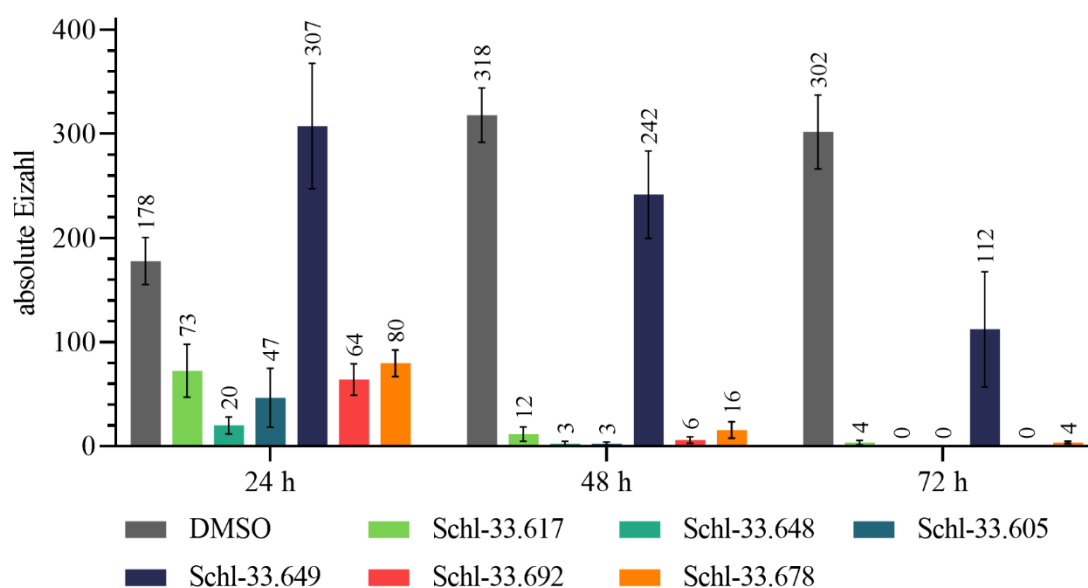
Strukturformel	Schl-33.	R =	Ranking
	...617		3
	...648		1
	...605		4
	...649		6
	...692		2
	...678		5

Das am wenigsten aktive Derivat, welches jedoch zu Phänotypen führte, war das Schwefelsäurediamid **Schl-33.649** mit einem Thiomorpholin- und einem 4-Cyanbenzyl-Rest. Es zeigte nach 72 h eine 80%-ige Inhibition der Paarungsstabilität und etwa 35%-ige Inhibition der Motilität (**Abb. 139**). Des Weiteren löste es innerhalb von 48 h mittelstarke Darmdilatationen aus. Auf die Eiproduktion hatte es keinen Einfluss (**Abb. 140**). Etwas aktiver war das Derivat **Schl-33.678** mit einem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest anstelle des

4-Cyanbenzyl-Restes, das die Motilität über 72 h um 20% stärker inhibierte. Das Paarungsverhalten indessen wurde bereits nach 48 h schon zu 90% gehemmt und auch die Eiproduktion ging zu jenem Zeitpunkt bereits auf etwa 15 Eier pro 24 h zurück. Zudem traten schwache bis mittlere Tegumentschäden auf. Es folgt das Schwefelsäurediamid **Schl-33.605** mit Boc-Piperazinyl- und 4-Cyanbenzyl-Rest. Dieses verursachte nach bereits 24 h starke Darmdilatationen und ab 48 h dann auch mittelstarke Tegumentschäden. Es reduzierte die Motilität innerhalb von 72 h um etwa 50%. Außerdem wurde die Eiproduktion nach 48 h annähernd zu 100% gehemmt und die vollständige Entpaarung aller Schistosomenpärchen konnte beobachtet werden. **Schl-33.617** wiederum mit einem Boc-Piperazinyl- und einem 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest führte zu einer vergleichbaren Reduktion der Motilität. Vereinzelt traten in Einzeltestungen auch letale Effekte auf. Darmdilatationen und Tegumentschäden waren ähnlich stark ausgeprägt, traten nur um 24 h verspätet auf (**Abb. 144**). Bei 5  $\mu\text{M}$  wurde die Motilität noch um 30% und die Paarungsstabilität um 50% reduziert. Phänotypen waren mitunter weiterhin sichtbar. Ähnlich verhielt sich auch **Schl-33.692** mit einem Boc-Piperazinyl- und einem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest, das hinsichtlich der Tegumentschäden aber etwas schwächer war. Starke Darmdilatationen und eine vollständige Inhibition der Eiproduktion zeigte es jedoch bis zu einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$ . Die Paarungsstabilität war hier sogar noch bei 3  $\mu\text{M}$  zu 100% aufgehoben, während die Motilität bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  um etwa 55% zurückging und damit deutlich beeinflusst wurde. Auch **Schl-33.648** mit einem 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest anstelle des 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Restes und einem Thiomorpholin-Rest wirkte unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  deutlich. Bei 10  $\mu\text{M}$  indessen wies es zusätzlich noch letale Effekte auf. Bis zu 4  $\mu\text{M}$  führte es zu Darmdilatationen mittlerer Stärke sowie einer Entpaarung von 70% und einer Reduktion der Motilität von 40%. Die Inhibition der Eiproduktion blieb erst ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  aus.

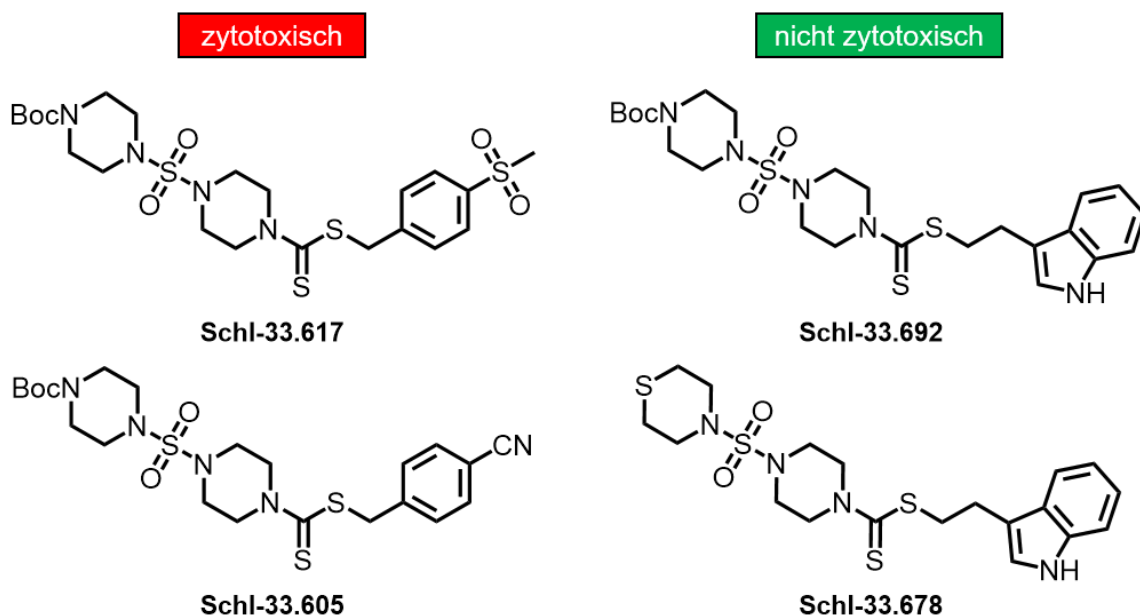


**Abbildung 139:** WMS der Schwefelsäurediamid-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich



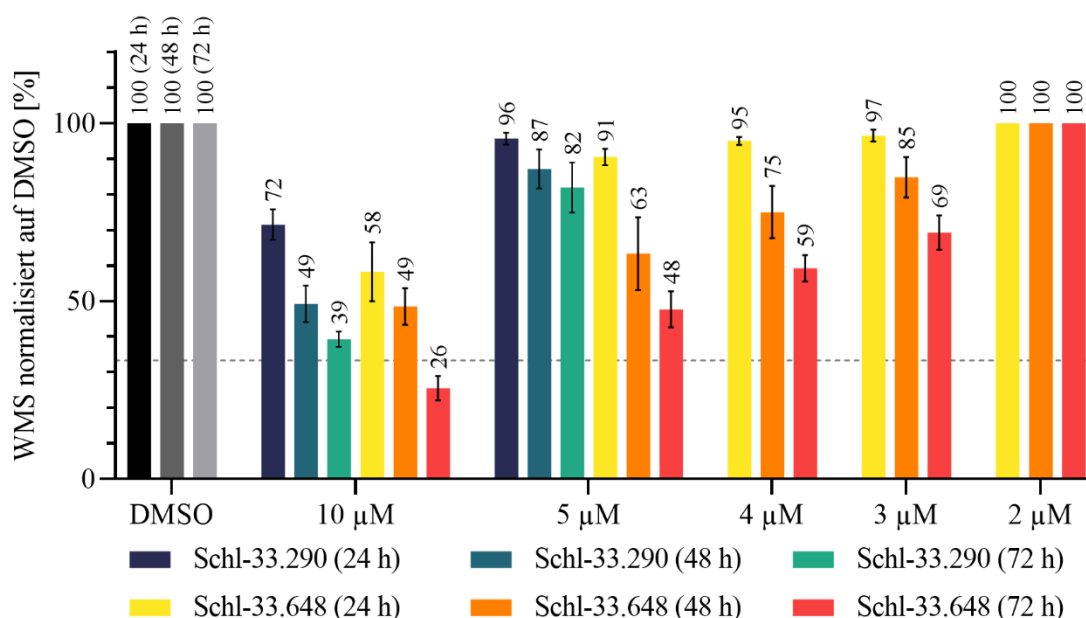
**Abbildung 140:** Absolute Eizahlen der Schwefelsäurediamid-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich

Sowohl **Schl-33.678** als auch **Schl-33.692**, die beide einen 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest tragen, waren gegenüber der HepG2-Zelllinie bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch (**Abb. 141**). Das Schwefelsäurediamid **Schl-33.605** mit Boc-Piperazinyl-Teilgerüst und *para*-Cyanbenzyl-Rest wirkte sich indessen schon ab 50  $\mu\text{M}$  negativ auf HepG2-Zellen aus. Für **Schl-33.617** mit *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest traf dies zusätzlich auch auf den LS174T-Zelltyp zu. Die Ergebnisse der Zytotoxizität von **Schl-33.648** und **Schl-33.649** mit Thiomorpholin-Teilgerüst stehen noch aus.



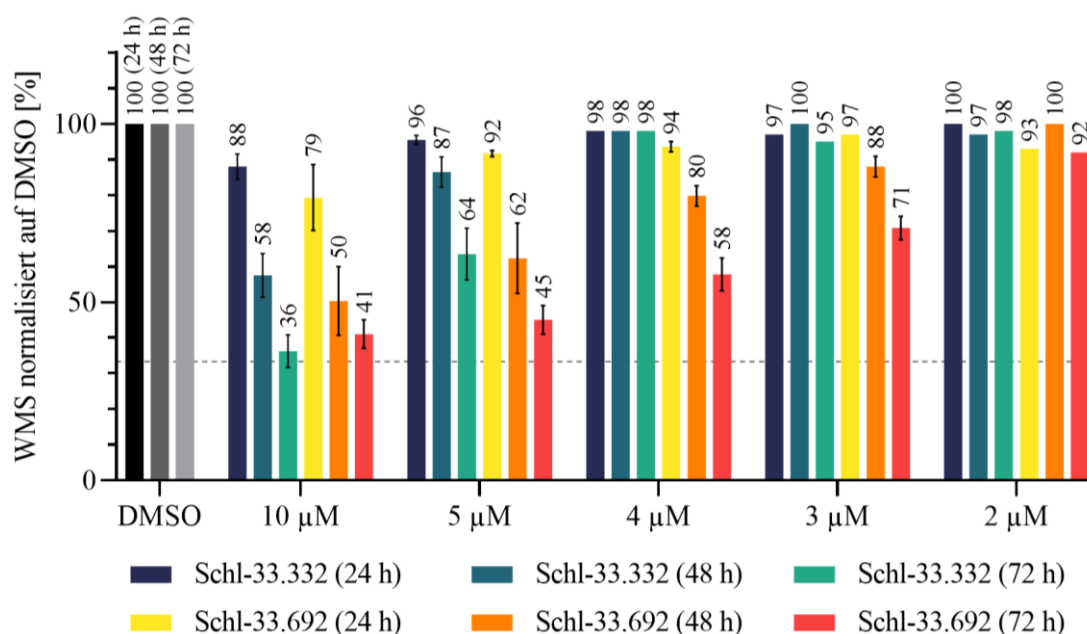
**Abbildung 141:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.617/605** bei 50  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.692/678** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie (**Schl-33.617** zusätzlich auch zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$  gegenüber der LS174T-Zelllinie)

Das aktivste Schwefelsäurediamid mit Thiomorpholin- und 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest **Schl-33.648** war bei 10  $\mu\text{M}$  mit dem Derivat **Schl-33.290** mit Thiomorpholin- und 4-Nitrobenzyl-Rest hinsichtlich des Einflusses auf die Paarungsstabilität in etwa vergleichbar. Bezogen auf die Reduktion der Eiproduktion wirkte das 4-Nitrobenzyl-Derivat jedoch 24 h später. Auch war dessen Einfluss auf die Reduktion der Motilität über 72 h etwa 15% weniger stark. Jedoch zeigte das 4-Nitrobenzyl-Derivat im Mittel etwas stärkere Phänotypen. Unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  war es im Gegensatz zum 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Derivat annähernd wirkungslos (**Abb. 142**).



**Abbildung 142:** WMS der Schwefelsäurediamid-Derivate **Schl-33.648** und **Schl-33.290** nach 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich

**Schl-33.692** als das aktivste Derivat mit Boc-Piperazinyl- und 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest zeigte gegenüber seinem Analogon mit Boc-Piperazinyl- und 4-Nitrobenzyl-Rest (**Schl-33.332**) bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  über 72 h eine 50% stärkere Inhibition der Paarungsstabilität sowie 20% stärkere Reduktion der Motilität. Außerdem führte es im Gegensatz zu dem 4-Nitrobenzyl-Derivat auch noch zu einer signifikanten Reduktion der Eiproduktion und stärker ausgeprägten Darmdilatationen. Während das 4-Nitrobenzyl-Derivat unterhalb von 5  $\mu\text{M}$  keine Wirkung mehr entfaltete, zeigte das 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Derivat noch Aktivität (**Abb. 143**).



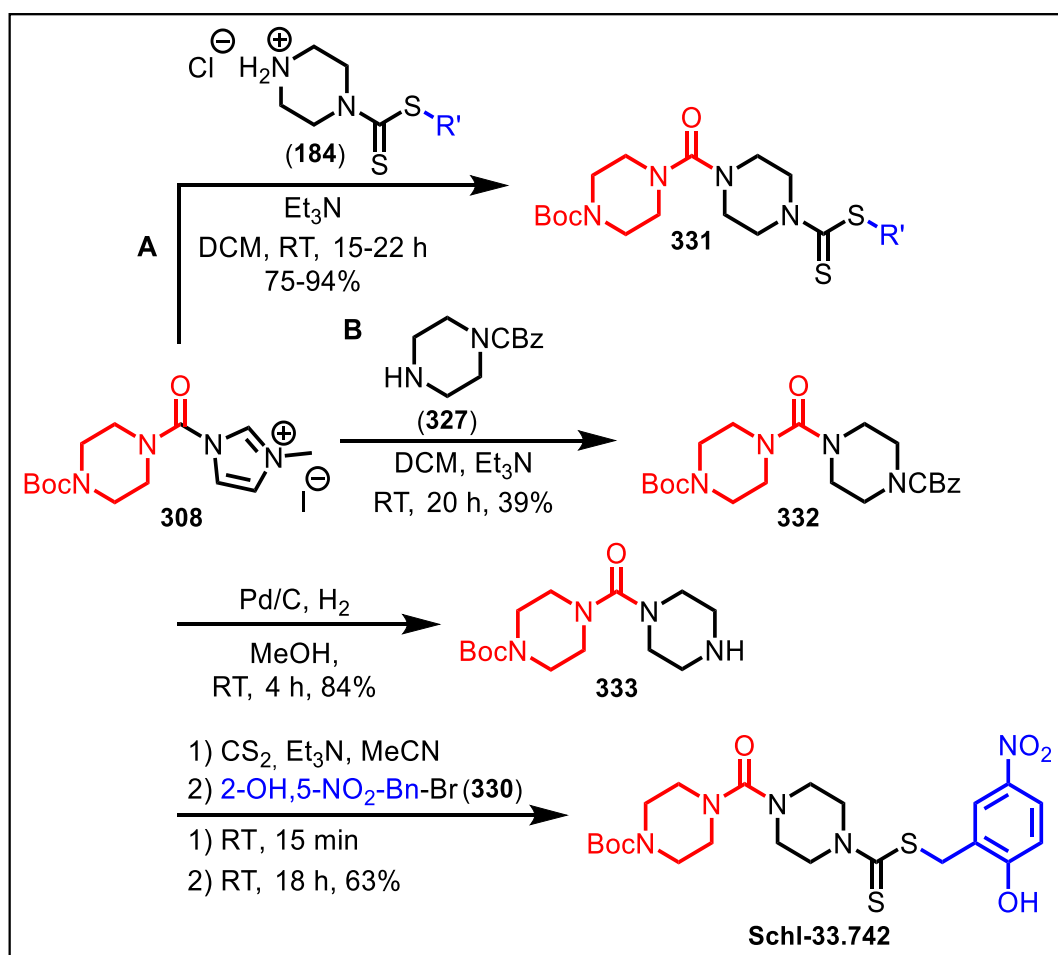
**Abbildung 143:** WMS der Schwefelsäurediamid-Derivate **Schl-33.692** und **Schl-33.332** nach 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich



**Abbildung 144:** Exemplarische Phänotypen der Schwefelsäurediamid-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 4  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  nach 72 h; **Schl-33.617**: Weibchen mit schwachen Darmdilatationen (im Bereich der Geschlechtsorgane/Speiseröhre); **Schl-33.648/692**: Weibchen mit schweren Darmdilatationen (großflächig aufgebläht, Verlust innerer Strukturen)

### Dithiocarbamat-Derivate mit Harnstoff-/Thioharnstoff-Teilgerüst

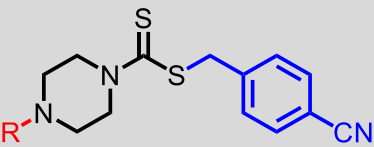
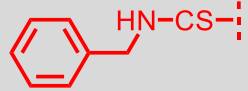
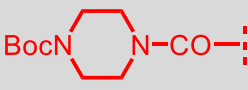
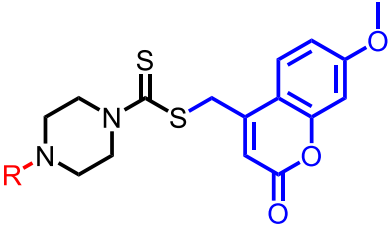
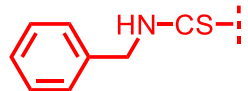
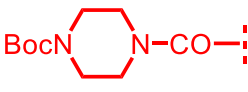
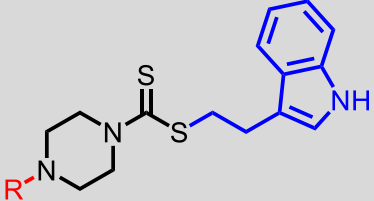
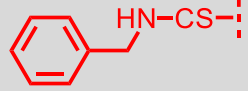
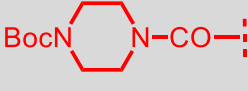
Die Synthese der Benzylthioharnstoffe orientierte sich an der Syntheseroute, welche im Abschnitt 3.5 „Harnstoffe/Thioharnstoffe“ ausführlich beschrieben wurde. Diese ging von Benzyliothiocyanat aus (Schema 56). Für die Harnstoff-Derivate mit Bis-Piperazinyl-Teilgerüst wurde die Synthese ausgehend von 1,1'-Carbonyldiimidazol genutzt. Dabei gab es zwei leicht abgewandelte Vorgehensweisen, die im Wesentlichen zu der, der Schwefelsäurediamide, die vorhergehend beschrieben wurden, kongruent sind. Es gelten die für die Synthese der Harnstoffe im Allgemeinen verwendeten Reaktionsbedingungen (Schema 63, A+B).



**Schema 63:** Abgewandelte Syntheseroute zur Darstellung der Harnstoff-Derivate der Kombinationsserie 2

Von den Harnstoff- und Thioharnstoff-Derivaten waren insgesamt sechs Verbindungen aktiv. Dabei zeigte sich, dass mit dem 4-(Methylsulfonyl)benzyl-, dem 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl- und dem Cyclohexylmethyl-Rest keine antischistosomale Aktivität einherging. Mit dem 4-Cyanbenzyl-, dem (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl- und dem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest konnten jedoch sowohl für die Thioharnstoffe mit Benzyl-Rest als auch für die Harnstoffe mit Boc-Piperazinyl-Rest aktive Verbindungen erhalten werden (Tab. 35).

**Tabelle 35:** *Gerankte* Strukturen der aktiven Dithiocarbamate mit Harnstoff-/Thioharnstoff-Teilstruktur bezüglich der antischistosomalen Aktivität (1 = am aktivsten; 6 = am wenigsten aktiv)

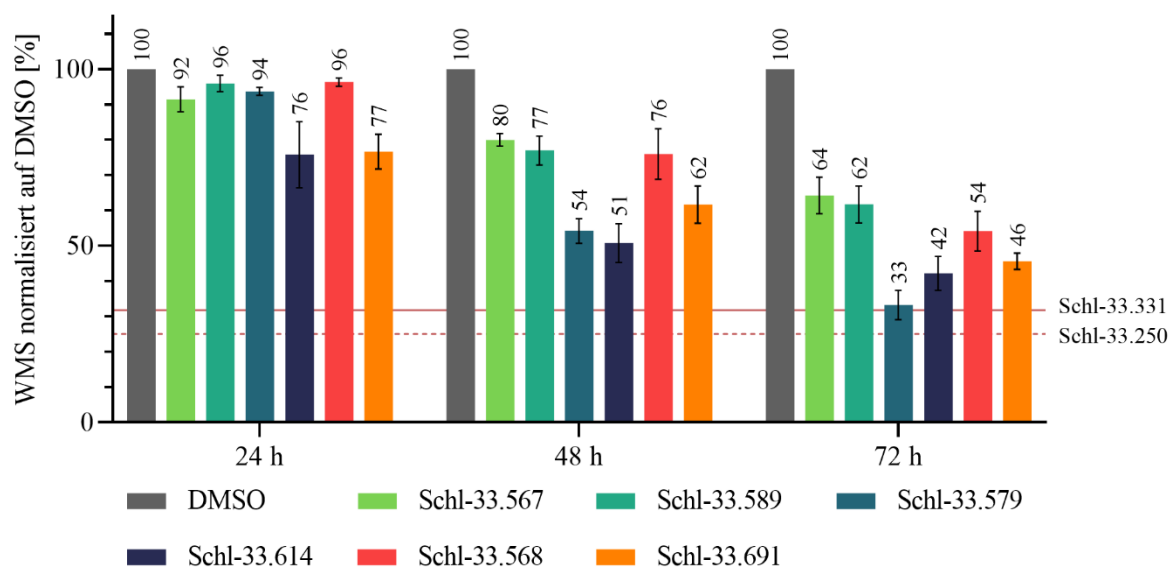
Strukturformel	Schl-33.	R =	Ranking
	...567		5
	...589		4
	...579		3
	...614		2
	...568		6
	...691		1

Als am wenigsten aktive Verbindung ist der Thioharnstoff **Schl-33.568** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest zu nennen. Dieser führte bei einer Konzentration von 10 µM über 72 h zu einer 45%-igen Inhibition der Motilität (**Abb. 145**). Weiterhin wurden 50% aller Würmer entpaart. Auch die Eiproduktion lag abschließend nur noch bei etwa 30 Eieren pro 24 h (**Abb. 146**). Des Weiteren konnten vereinzelt Schädigungen des Teguments und des Darms beobachtet werden. Der Austausch des 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Restes gegen einen 4-Cyanbenzyl-Rest führte zu **Schl-33.567**. Diese Verbindung wich in ihrer Aktivität nur unwesentlich von **Schl-33.568** ab. Bezogen auf die Paarungsstabilität war diese Verbindung allerdings um 20% aktiver, hinsichtlich der Motilität jedoch um 10% schwächer wirksam. Darmdilatationen waren nicht mehr nur schwacher, sondern mittlerer Intensität und traten regelmäßiger auf. Noch deutlicher ausgeprägt waren die Dilatationen des Darms bei dem Harnstoff-Derivat **Schl-33.589** mit 4-Cyanbenzyl-Rest, das jedoch keine Tegumentschäden verursachte. Während eine Reduktion der absoluten Eizahl zuvor erst nach 72 h sichtbar wurde, trat diese in diesem Fall bereits innerhalb der ersten 24 h auf und es konnten nur noch etwa 40 Eier gezählt werden. Sowohl der Harnstoff **Schl-33.614** als auch der Thioharnstoff **Schl-33.579** mit (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest waren in etwa gleich aktiv. Sie beeinflussten die Eiproduktion und Paarungsstabilität innerhalb von 72 h nahezu vollständig und führten auch zu einer etwa

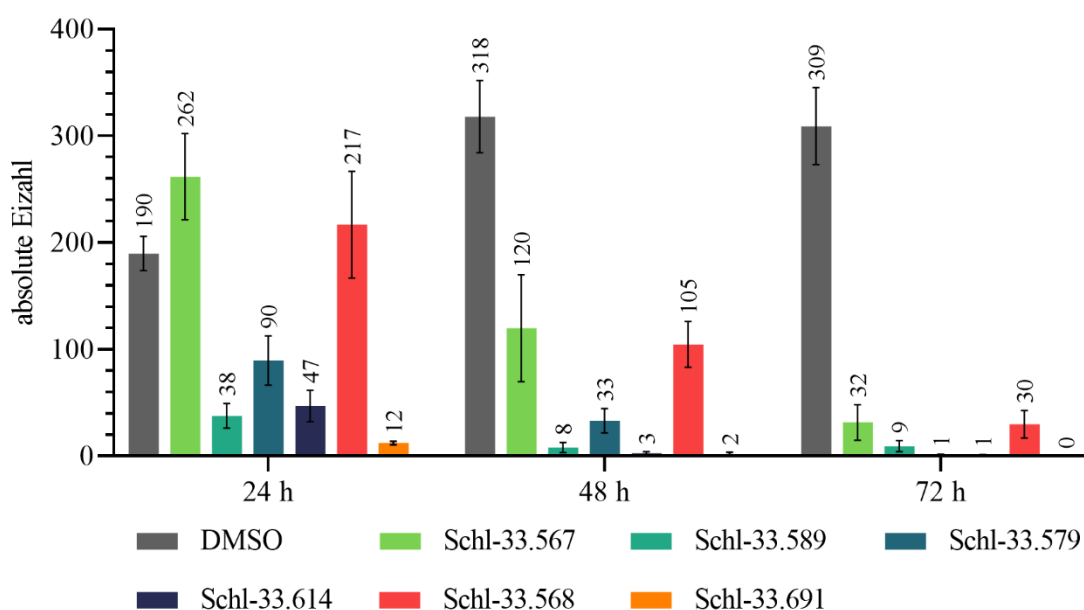


60%-igen Reduktion der Motilität. Dabei waren alle Parameter bereits nach 48 h in Teilen reduziert. Die Eiproduktion wurde durch **Schl-33.614** um 24 h früher gehemmt als bei **Schl-33.579**. Letzteres zeigte dafür aber vereinzelt letale Effekte. Während das Harnstoffderivat zu starken Darmdilatationen und Tegumentschäden mittlerer Stärke führte, zeigten sich die Effekte bei dem Thioharnstoff-Derivat in umgekehrter Ausprägung. Das Harnstoff-Derivat hatte auch bei 5  $\mu\text{M}$  noch einen schwachen Effekt auf die Eiproduktion sowie die Paarungsstabilität und führte zu einer etwa 30%-igen Reduktion der Motilität. Auch löste es vereinzelt schwache Darmdilatationen aus. Das Harnstoff-Derivat **Schl-33.691** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest war die aktivste Verbindung der Harnstoff- und Thioharnstoff-Derivate aus der Kombinationsserie 2. Sie bewirkte bei 10  $\mu\text{M}$  neben einer fast vollständigen Reduktion der Eiproduktion innerhalb der ersten 24 h eine 80%-ige Entpaarung der Schistosomen und 55%-ige Inhibition der Motilität. Die beiden letztgenannten Parameter wurden dabei jedoch nicht innerhalb von 24 h, sondern über 72 h hinweg in der geschilderten Art und Weise beeinflusst. Nach 48 h konnten zudem vereinzelt schwache Tegumentschäden und bereits nach 24 h sehr starke Darmdilatationen wahrgenommen werden. Bei 5  $\mu\text{M}$  wurde nur noch die Eiproduktion über 72 h stark gehemmt und es traten schwache bis mittelstarke Dilatationen des Darms auf (**Abb. 148**).

Vergleicht man die Wirksamkeit des aktivsten Thioharnstoff-Derivats **Schl-33.579** mit einem (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest R' mit dem analogen Thioharnstoff **Schl-33.250** mit identischem Rest R und 4-Nitrobenzyl-Rest R', so zeigt sich, dass das 4-Nitrobenzyl-Derivat insofern wirksamer ist, als es früher anschlägt und stärkere Wirkung entfaltet. Unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  führt dann nur noch das 4-Nitrobenzyl-Derivat vereinzelt zum Auftreten von schwachen Darmdilatationen. Das aktivste Harnstoff-Derivat **Schl-33.691** mit einem 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest R' fiel gegenüber dem entsprechenden Harnstoff-Derivat **Schl-33.331** mit 4-Nitrobenzyl-Rest R' in seiner Wirkung ebenfalls ab. Bei 5  $\mu\text{M}$  war das 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Derivat bezogen auf die Paarungsstabilität um 70% und bezogen auf die Reduktion der Motilität um 40% weniger aktiv. Darmdilatationen waren hier schwächer ausgeprägt. Lediglich hinsichtlich der Inhibition der Eiproduktion zeigte **Schl-33.691** vergleichbare Effekte. Das 4-Nitrobenzyl-Derivat wirkte zudem auch noch deutlich unterhalb von 5  $\mu\text{M}$ , das 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Derivat dagegen nicht.

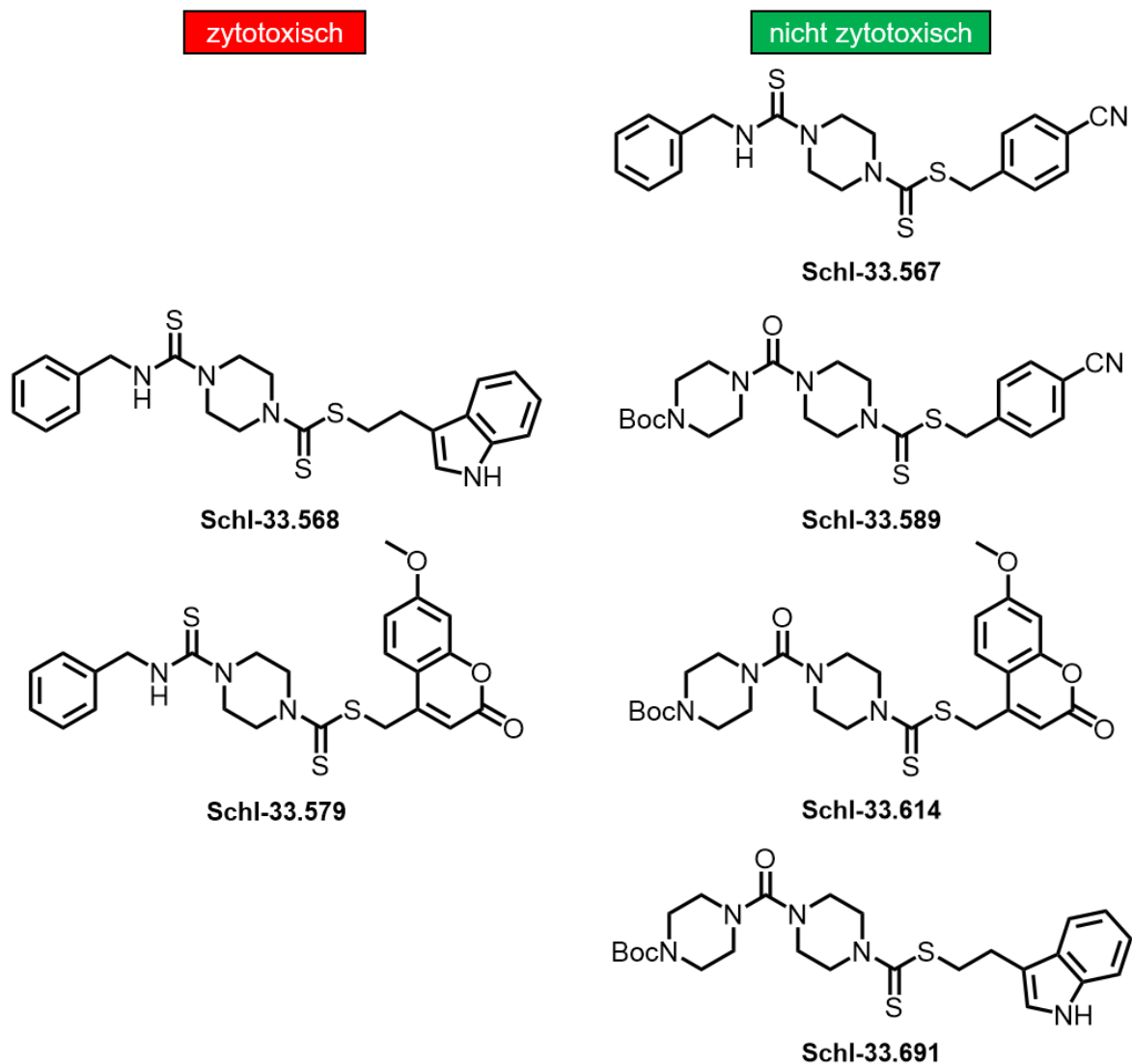


**Abbildung 145:** WMS der (Thio-)harnstoff-Derivate der Kombiserie 2 bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich

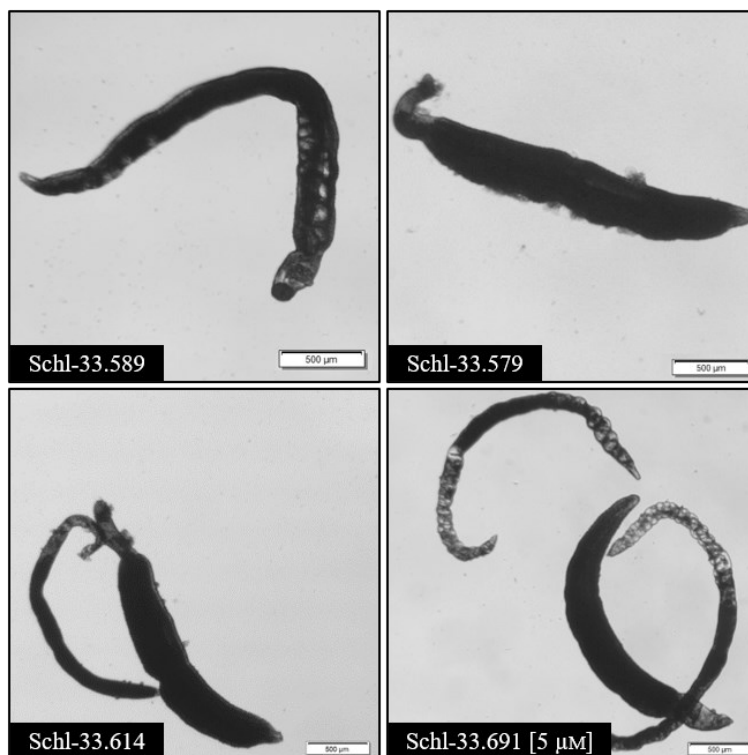


**Abbildung 146:** Absolute Eizahlen der (Thio-)harnstoff-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich

Von den Thioharnstoffen wirkte nur **Schl-33.567** mit *para*-Cyanbenzyl-Rest bis 100  $\mu\text{M}$  nicht auf HepG2-Zellen; **Schl-33.568** und **Schl-33.579** waren ab 50  $\mu\text{M}$  zytotoxisch (Abb. 147). Von den Harnstoff-Derivaten war **Schl-33.614** mit (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest bis 50  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch für HepG2-Zellen. **Schl-33.589** mit *para*-Cyanbenzyl-Rest wirkte zudem auch bis 100  $\mu\text{M}$  nicht auf LS174T-Zellen. **Schl-33.691** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest war für HepG2-Zellen bis 100  $\mu\text{M}$  untoxisch.



**Abbildung 147:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.568/579/589/614** bei 50  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.567/691** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie (**Schl-33.567/579/** zusätzlich bei 50  $\mu\text{M}$  zytotoxisch gegenüber der LS174T-Zelllinie; **Schl-33.589** bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch gegenüber der LS174T-Zelllinie)

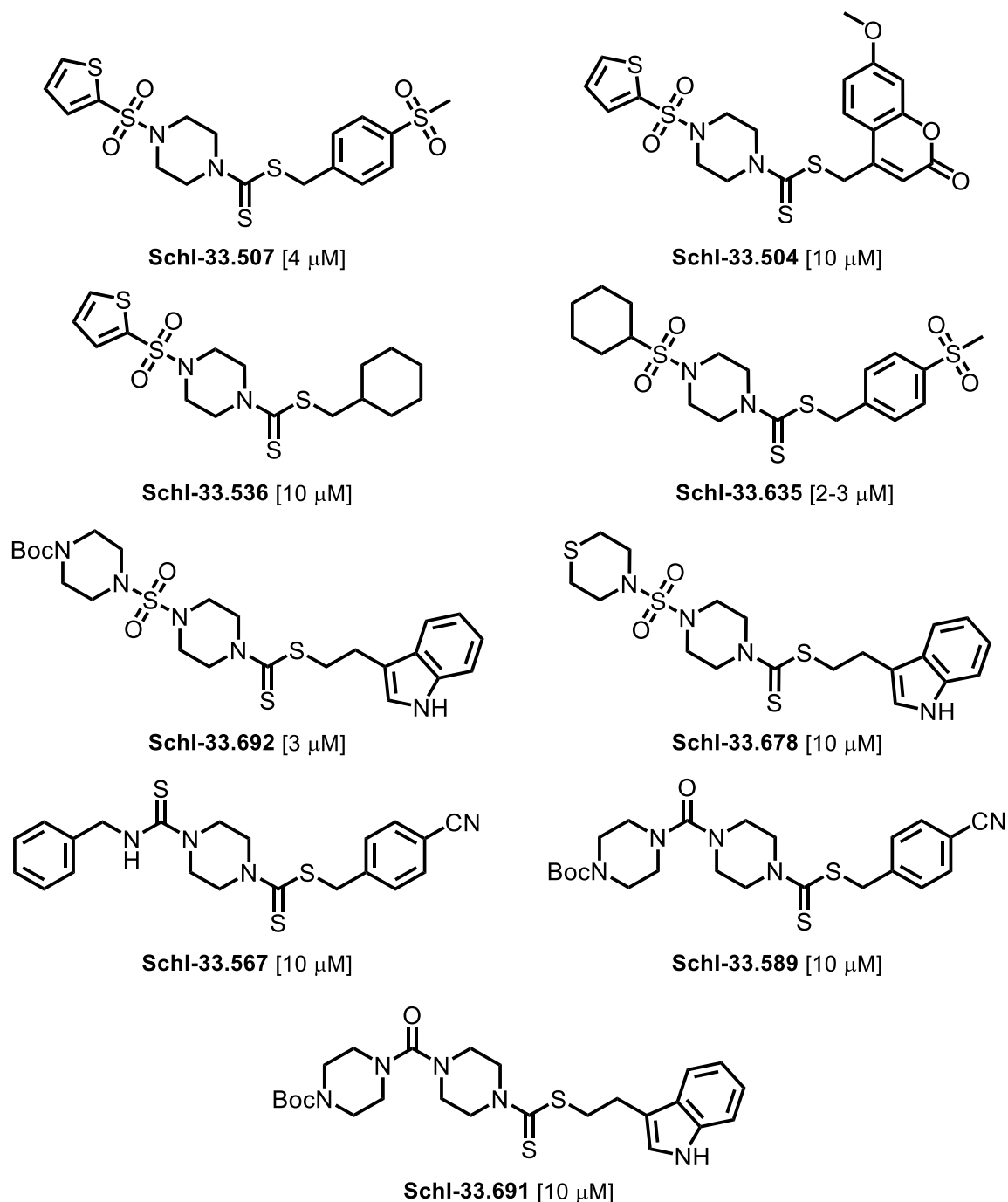


**Abbildung 148:** Exemplarische Phänotypen der (Thio-)Harnstoff-Derivate der Kombinationsserie 2 bei 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h; **Schl-33.589**: bananenschalenförmig geöffnetes Männchen mit Darmdilatationen; **Schl-33.579**: Männchen mit Tegumentablösung; **Schl-33.614**: Männchen und Weibchen mit Warzen/Tegumentbläschen; **Schl-33.691**: Weibchen mit mittleren-schweren Darmdilatationen (am proximalen und distalen Ende)

Von den insgesamt sechsunddreißig Verbindungen der zweiten Kombinationsserie waren neunzehn bei der initial getesteten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aktiv. Von diesen wiederum zeigten acht auch noch bei 5  $\mu\text{M}$  eine Wirksamkeit. Die Hälfte davon war sogar bis zu einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  (**Schl-33.507**, **Schl-33.648**, **Schl-33.692**) und eine einzige Verbindung (**Schl-33.635**) bis zu 2  $\mu\text{M}$  aktiv. Hier zeichnete sich dasselbe Bild ab, welches auch schon zuvor in den einzelnen Optimierungsserien entstanden war. Demnach waren die Harnstoffderivate weniger aktiv als die Schwefelsäurediamide, die ihrerseits wiederum etwas weniger aktiv als die Sulfonamide waren. Mit dem 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest konnten keinerlei aktive Verbindungen dargestellt werden; auch der Cyclohexylmethyl-Rest führte nur in Ausnahmen zu wirksamen Verbindungen. Beide genannten Reste sollten daher für weitere Arbeiten nicht mehr berücksichtigt werden. Insgesamt war der 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest der wirksamste. Es folgen der (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl- und der 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest. Am wenigsten aktiv waren im Schnitt die Derivate mit einem 4-Cyanbenzyl-Rest. Wie die jeweiligen Vergleiche mit den entsprechenden 4-Nitrobenzyl-Derivaten zeigen, wurden sowohl in der Stoffklasse der Sulfonamide als auch in der Reihe der Schwefelsäurediamide durch den Austausch des 4-Nitrobenzyl-Restes gleichwohl aktive Verbindungen erhalten.

Diese waren zum Teil sogar aktiver als jene Derivate mit 4-Nitrobenzyl-Rest. Insbesondere mit dem 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest konnten aktivere Verbindungen dargestellt werden.

In **Abbildung 149** sind die neun ab 10  $\mu\text{M}$  antischistosomal aktiven und bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zellschädigenden Verbindungen bezogen auf die HepG2- und/oder LS174T-Zelllinie der sechzehn untersuchten Verbindungen der Kombinationsserie 2 gezeigt.



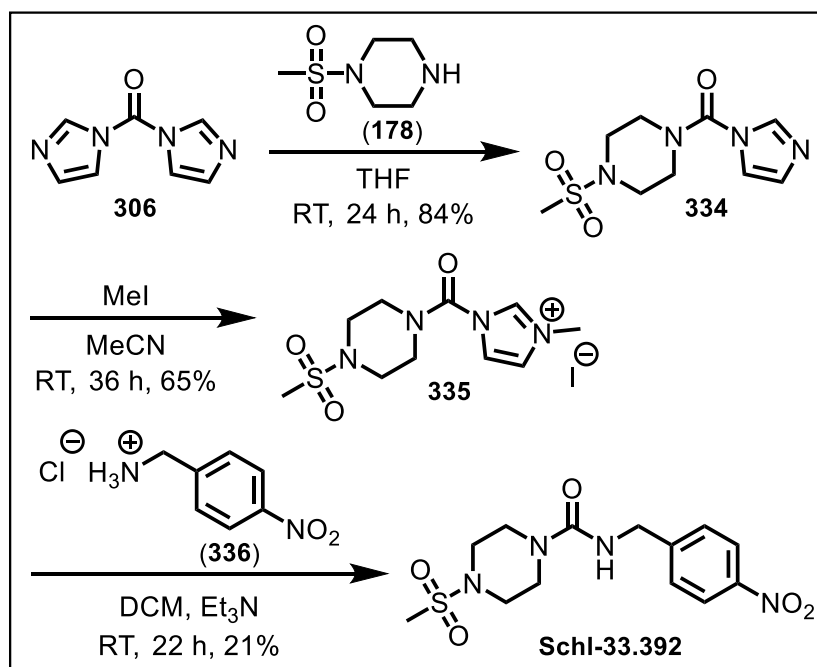
**Abbildung 149:** Strukturformeln der wirksamsten und bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxischen Derivate der Kombinationsserie 2 und deren jeweils niedrig wirksamste Konzentration

### 3.7 Rückbau der Verbindung Schl-32.329

#### 3.7.1 Ersatz der Dithiocarbamatfunktion

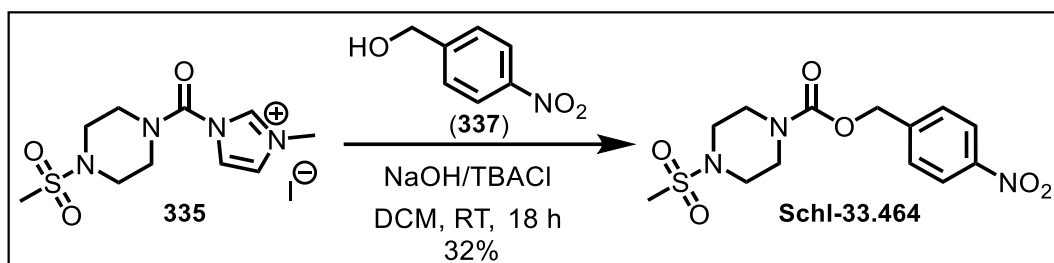
Um die Notwendigkeit der Dithiocarbamat-Grundstruktur, die in der Arbeit von P. MÄDER als essenziell für die antischistosomale Aktivität ausgemacht wurde, zu überprüfen und damit vorhandene Testergebnisse zu validieren, wurde im Folgenden eine Variation der Heteroatome des Dithiocarbamats **Schl-32.329** vorgenommen.<sup>[286]</sup> Hierfür wurde zunächst die Thiocarbonyl-Gruppe gegen eine Carbonylgruppe ausgetauscht und ein Thiolurethan (**Schl-33.784**) dargestellt. Darauffolgend wurde dann das einfachgebundene Schwefelatom gegen ein Stickstoff- oder Sauerstoffatom ersetzt und somit ein Harnstoff (**Schl-33.392**) oder Carbamat (**Schl-33.464**) gebildet.

Die Darstellung der Derivate gelang ausgehend von 1,1'-Carbonyldiimidazol (**306**), welches zunächst mit 1-(Methylsulfonyl)piperazin (**178**) in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht wurde. Um die „Abgangsgruppenqualität“ des zweiten Imidazol-Restes zu verbessern, folgte eine Alkylierung mit MeI. Eine weitere nucleophile Substitutionsreaktion mit dem entsprechenden Amin-Hydrochlorid **336** und Et<sub>3</sub>N ergab das gewünschte Produkt **Schl-33.392**. Dieses konnte bei Raumtemperatur problemlos erhalten werden (**Schema 64**).



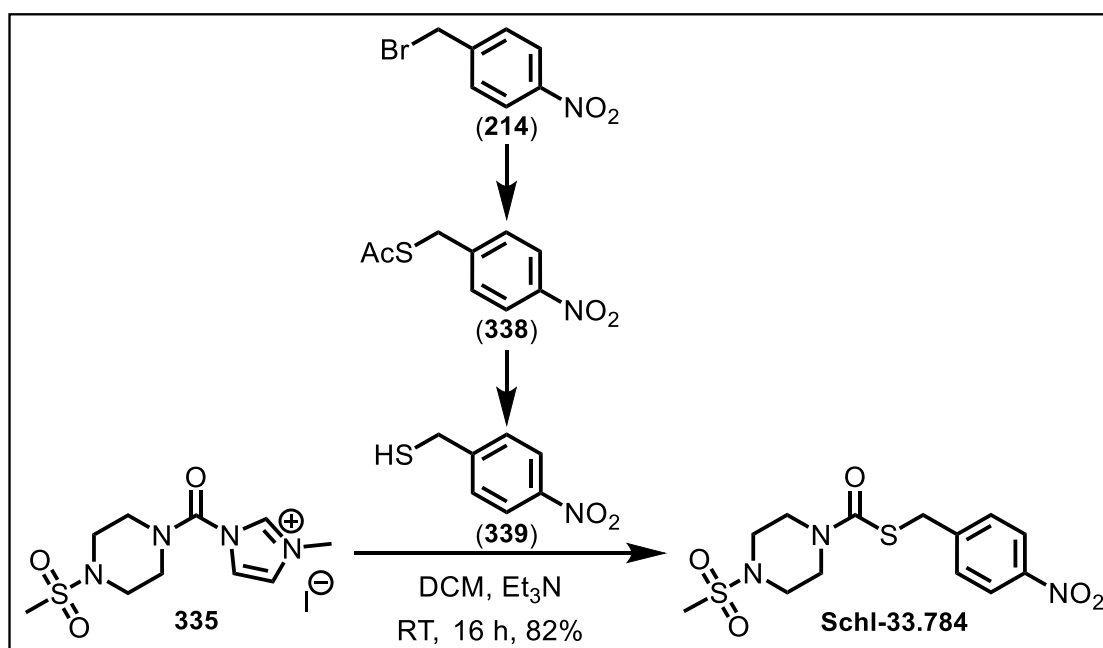
**Schema 64:** Syntheseroute zur Darstellung des Harnstoff-Derivats **Schl-33.392**

Auch das Carbamat **Schl-33.464** wurde nach analoger Syntheseroute dargestellt. Lediglich die Umsetzung mit dem Benzylalkohol (**337**) erfolgte durch den Einsatz von Natriumhydroxid und dem Phasentransferkatalysator Tetrabutylammoniumchlorid in leicht abgewandelter Form (**Schema 65**).



**Schema 65:** Transferkatalyse zur Darstellung des Carbamat-Derivats Schl-33.464

Während das Benzylamin **336** und der Benzylalkohol **337** kommerziell erhältlich waren, musste das Thiol **339** selbst dargestellt werden, was ausgehend von *para*-Nitrobenzylbromid (**214**) in Kooperation mit T. GALLINGER geschah. Die Syntheseoptimierung jener Reaktion, die nicht Teil dieser Arbeit war, soll hier nicht weiter thematisiert werden. Über den Thioester **338** und dessen saure Hydrolyse war das Thiol **339** letztlich zugänglich (**Schema 66**).

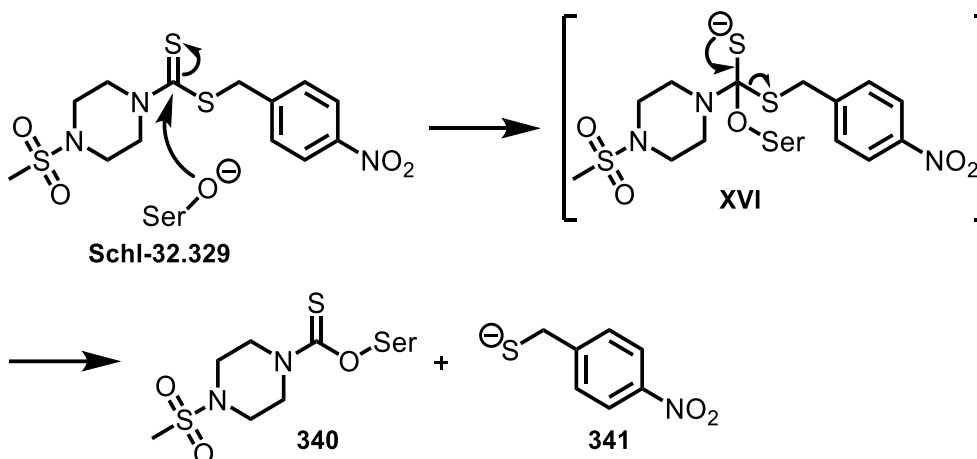


**Schema 66:** Synthesesequenz ausgehend von *para*-Nitrobenzylbromid zur Darstellung des Thiolurethan-Derivats Schl-33.784

Alle Reaktionsprodukte konnten erfolgreich synthetisiert werden, wobei die unterschiedlichen Ausbeuten mit der unterschiedlichen Nucleophilie der Edukte erklärt werden können. Während das am stärksten nucleophile Thiol mit 82% die beste Ausbeute innerhalb der Reihe der drei Verbindungen (Schl-33.392/464/784) erzielte, ergab das Benzylamin, welches weniger nucleophil ist, nur eine Ausbeute von 21%.

Für einen möglichen Wirkmechanismus wurde eine kovalente Modifikation des Zielenzyms (**340**) nach Reaktion mit einem Serin- oder Cystein-Molekül in Erwägung gezogen. Daher sollte ein Austausch nur eines einzigen Atoms am Carbonylkohlenstoffatom eine Änderung der Reaktivität hervorrufen. Der nucleophile Angriff auf das zentrale

Kohlenstoffatom von **Schl-32.329** hätte die Bildung einer tetraedrischen Zwischenstufe (**XVI**) zur Folge, die daraufhin unter Bildung eines Thiolat-Anions (**341**) zerfällt (**Schema 67**). Der Schwefel, der die entstehende negative Ladung aufgrund seiner Größe sehr gut stabilisieren kann, sollte die beste Abgangsgruppe sein. Das Alkoholat ist demgegenüber aufgrund der geringeren Stabilisierung der entstehenden negativen Ladung eine schlechtere Abgangsgruppe. Ein Amid ist dagegen kaum in der Lage, die entstehende negative Ladung zu stabilisieren. Vermutet wurde also ein Rückgang beziehungsweise der Verlust der antischistosomalen Aktivität durch den Austausch des einfach gebundenen Schwefelatoms. Auch der Austausch des doppelt gebundenen Schwefelatoms gegen ein Sauerstoffatom mit einer einhergehenden Minderung der Carbonylaktivität und damit einer Verringerung der Reaktivität gegenüber Nukleophilen sollte einen Rückgang der antischistosomalen Aktivität zur Folge haben. Insgesamt wurde also keine Wirkung des Harnstoff-Derivats **Schl-33.392** und eine sehr stark reduzierte Aktivität des Carbamat-Derivats **Schl-33.464** erwartet. Das Thiourethan-Derivat **Schl-33.784** sollte eine gegenüber dem Dithiocarbamat deutlich reduzierte Aktivität zeigen, jedoch von den drei genannten Verbindungen am aktivsten sein.



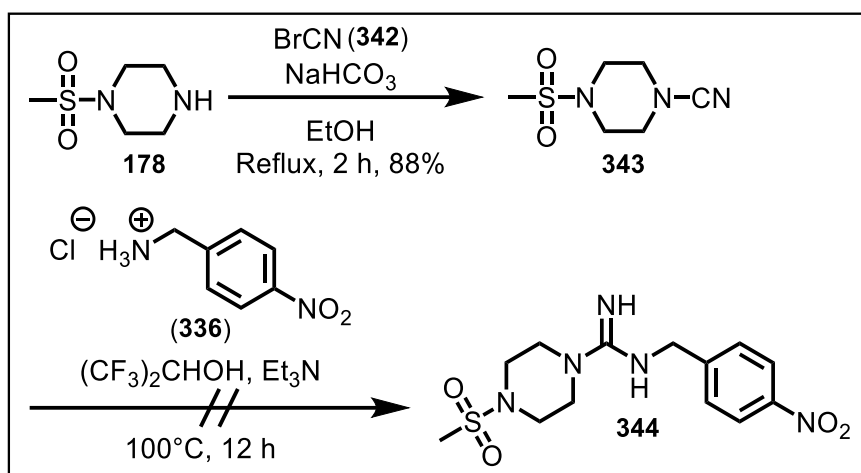
**Schema 67:** Möglicher Wirkmechanismus der Dithiocarbamat-Derivate durch kovalente Modifikation am Beispiel von Serin

Tatsächlich zeigte das Thiourethan **Schl-33.784** bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine (wenn überhaupt) sehr schwache antischistosomale Aktivität, die sich in einer schwach reduzierten Paarungsstabilität äußerte.

Auch die Synthese eines stark basischen Guanidins wurde in Angriff genommen. 1-(Methylsulfonyl)piperazin (**178**) ergab in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit Bromcyan (**342**) und Natriumhydrogencarbonat in Ethanol zunächst Cyanamid **343**, welches darauffolgend zum Guanidin **344** nach einer Vorschrift von SNIDER *et al.* in Hexafluorisopropanol umgesetzt werden sollte (**Schema 68**).<sup>[540]</sup> Weder die Bildung des

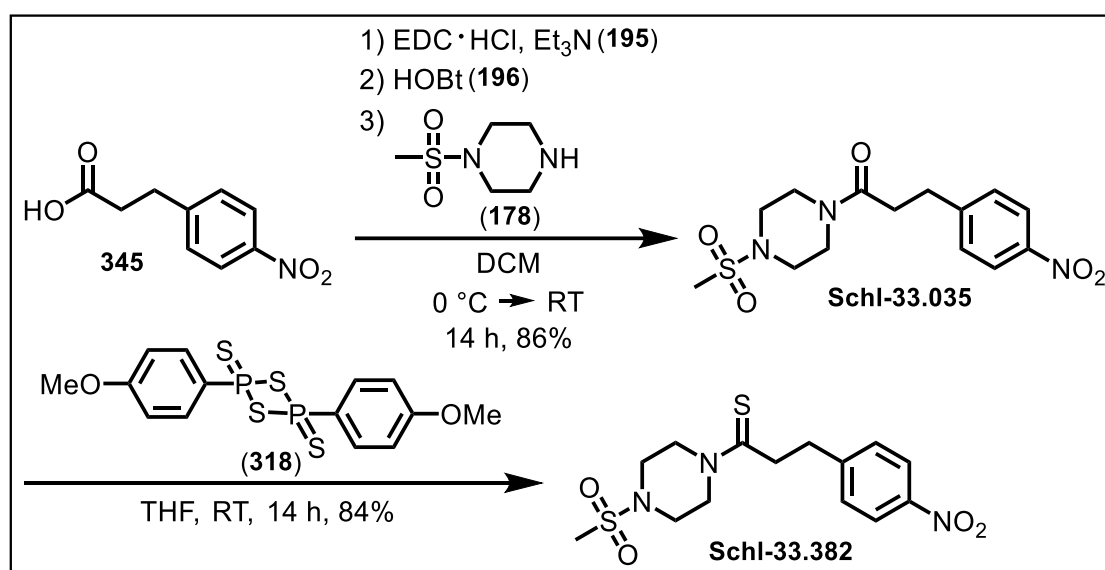


Guanidins noch die des möglichen Nebenprodukts *O*-Fluoralkylisoharnstoff wurden jedoch beobachtet. Nach einigen Optimierungsversuchen wurde die Synthese des Guanidin-Derivats dann erfolglos eingestellt und nicht weiterverfolgt. Ein möglicher alternativer Zugang wäre der über ein entsprechendes Thioharnstoff-Derivat. Dieses sollte sich gemäß AOYAGI *et al.* durch Methylierung mit MeI in *S*-Methylisothiuronium-Iodid überführen lassen, das mit einem Amin als Nucleophil schließlich in das Guanidin übergeht.<sup>[541]</sup>



**Schema 68:** Gescheiterte Darstellung des *N,N,N'*-trisubstituierten Guanidin-Derivats **344**

Schließlich wurde das einfach gebundene Schwefelatom durch eine Methylen-Gruppe ersetzt. Dazu wurde zunächst über eine EDC-Kupplung das entsprechende Amid **Schl-33.035** dargestellt, welches im nächsten Schritt dann mit *Lawessons*-Reagenz (**318**) umgesetzt wurde (**Schema 69**).

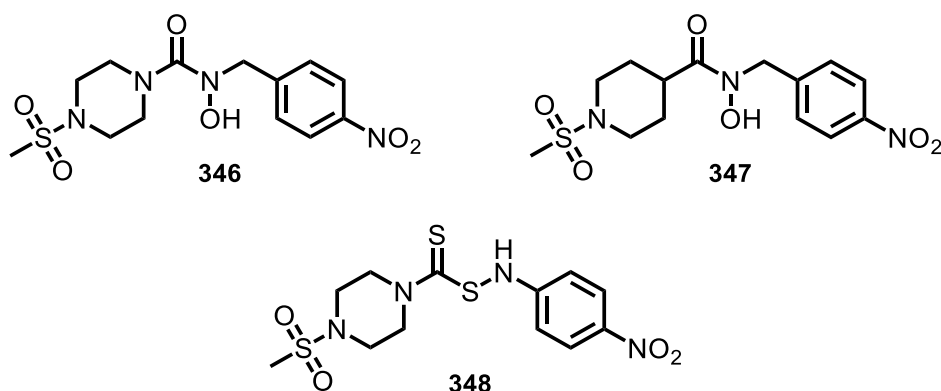


**Schema 69:** Syntheseroute zur Darstellung des Amid- und Thioamid-Derivats **Schl-33.035/382**

Dabei bildet das *Lawesson*-Reagenz, das sich in Lösung in einem Gleichgewicht mit einem reaktiveren Dithiophosphin-Ylid befindet, mit der Carbonylgruppe ein Thioxaphosphetan.

Dies wiederum führt über eine der *Wittig*-Reaktion analoge Ringöffnung zum Thioamid. Treibende Kraft der Reaktion ist die Bildung einer stabilen P=O-Bindung. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran und ergab das gewünschte Reaktionsprodukt **Schl-33.382** in einer Gesamtausbeute von 72%. Für das Thioamid **Schl-33.382** wie für das Amid **Schl-33.035** wurden aufgrund des Fehlens der guten Abgangsgruppe Thiolat keine antischistosomalen Aktivitäten erwartet. Diese Vermutung wurde durch die *in-vitro*-Testung bestätigt.

Da neben der kovalenten Modifikation des Zielenzyms auch die Komplexierung von zweiwertigen Metallkationen für die Wirkung der Dithiocarbamate verantwortlich sein könnte, sollte dieses in zukünftigen Arbeiten überprüft werden. Das Dithiocarbamat wäre dafür durch ein Hydroxamsäure-Derivat (**346**), ein *N*-Hydroxy-Harnstoff-Derivat (**347**) oder ein Thiocarbamoyl-Sulfenamid (**348**) zu ersetzen, die allesamt zur Bildung von Metallkomplexen befähigt sind und somit, sofern die Komplexierung für die antischistosomale Aktivität ursächlich wäre, ebenfalls aktiv sein sollten (**Abb. 150**).<sup>[542,543]</sup> Das für die Reaktion der Hydroxamsäure benötigte Hydroxylamin ließe sich, wie erste Versuche zeigten, ausgehend von *para*-Nitrobenzaldehyd durch Kondensation mit *O*-Benzyl-Hydroxylamin zum Oximether und anschließende Reduktion mit Dimethylaminoboran zum benzylgeschützten *para*-Nitro-Benzylhydroxylamin darstellen.

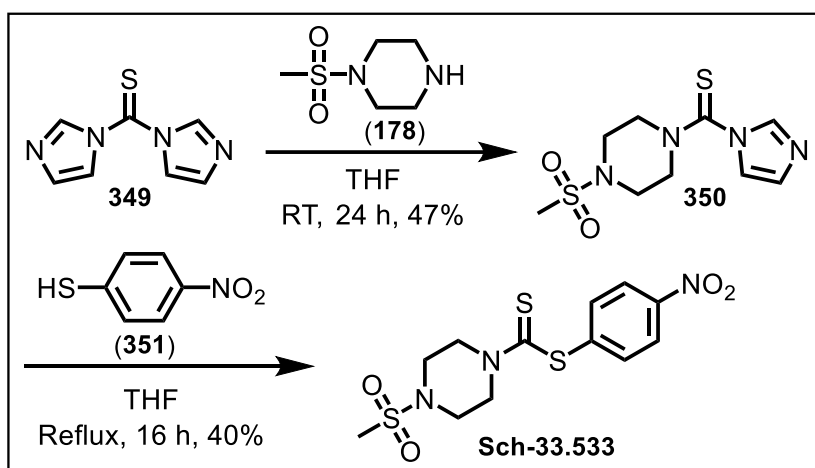


**Abbildung 150:** Strukturformel eines Hydroxamsäure- und Thiocarbamoylsulfenamid-Derivats

### 3.7.2 Austausch des *para*-Nitrobenzyl-Substituenten

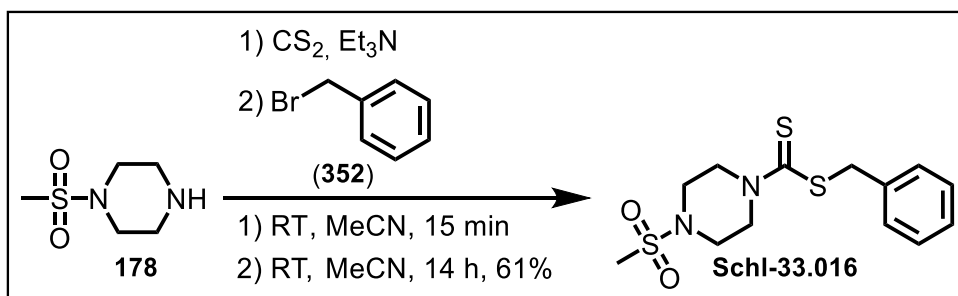
Um die Bedeutung der Länge des Linkers am einfach gebundenen Schwefelatom zu klären, wurde der Benzyl- durch einen Phenyl-Rest ersetzt. **Schl-33.533** konnte aus dem einfach substituierten Thiocarbonylimidazol-Derivat **350** mittels nucleophiler Substitutionsreaktion mit dem *para*-Nitrothiol **351** erhalten werden (**Schema 70**). Der starke Elektronenzug der Nitrogruppe wirkte sich dabei vermutlich positiv auf die Acidität des Thiols und damit dessen Nucleophilie aus. Der Austausch des Imidazol-Restes gegen das Nucleophil benötigte eine

höhere Reaktionstemperatur von etwa 80 °C. Eine Verbesserung der Abgangsgruppe durch Alkylierung wie beim *N,N'*-Thiocarbonyldiimidazol war aufgrund der höheren Nucleophilie am Thiocarbonylschwefelatom und dessen damit bevorzugter Alkylierung, nicht möglich. Die schlechte Abgangsgruppenqualität verbunden mit der verminderten Reaktivität eines Benzylalkohols und Benzylamins war vermutlich auch der Grund, warum ein Thiourethan- und Thioharnstoff-Derivat von **Schl-32.329** über diese Syntheseroute nicht zugänglich waren.



**Schema 70:** Nucleophile Substitutionsreaktion am Thiocarbonylimidazol-Derivat zur Verkürzung des Linkers *In vitro* führte das um eine Methylen-Einheit verkürzte Derivat **Schl-33.533** bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einem kompletten Verlust der antischistosomal Aktivität. Dieser Umstand spricht eher gegen die Reaktion mit einem Nucleophil als Wirkmechanismus, da das *para*-Nitrothiophenolat, das in besonderer Weise durch Mesomerie stabilisiert ist, eine noch bessere Abgangsgruppe als das *para*-Nitrobenzylthiolat darstellt.

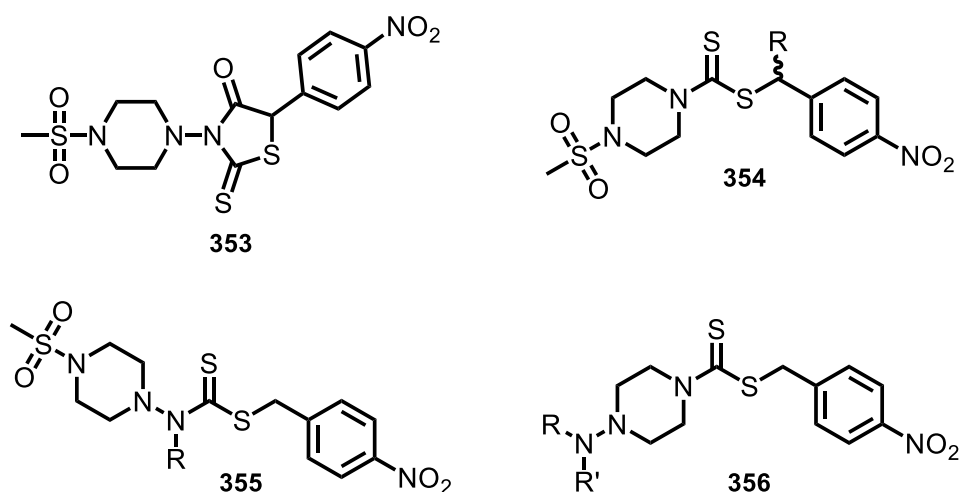
Die Notwendigkeit des Vorliegens einer Nitro-Gruppe in *para*-Position für die antischistosomale Wirksamkeit wurde durch die Darstellung des unsubstituierten Benzylderivats **Schl-33.016** ebenfalls überprüft. Die  $\text{NO}_2$ -freie Verbindung stellte sich als inaktiv gegenüber den Schistosomen heraus (**Schema 71**).



**Schema 71:** One-pot-Reaktion zur Darstellung des Dithiocarbamats mit unsubstituiertem Benzylrest

Damit konnte in Analogie zu der Arbeit von P. MÄDER gezeigt werden, dass sowohl die Dithiocarbamat- als auch die Nitro-Gruppe eng mit der antischistosomal Wirkung verknüpft sind.<sup>[286]</sup> Ein Austausch ist anscheinend mit einem großen Wirkungsverlust verbunden.

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturvariation bietet die Rigidisierung des Dithiocarbamats, die sich beispielsweise über ein *N*-Aminorhodanin-Derivat (**353**) realisieren lässt. Damit einher geht eine metabolische Stabilisierung, da eine Anfälligkeit gegenüber Nucleophilen vermindert wird. Oxidationsreaktionen sind gleichwohl weniger wahrscheinlich. Interessant wäre auch die Klärung, ob eine Verzweigung in der Benzylposition wie bei **354** einen zusätzlichen Gewinn an Aktivität bringt. Problematisch hierbei ist, dass dadurch ein Stereozentrum entstünde, womit verbunden das Auftreten von Stereoisomeren ist, die sich aufgrund ihrer gleichen chemischen Eigenschaften nur schwer trennen lassen. Ein weiterer Ansatzpunkt, welcher die Möglichkeit für eine Verzweigung auf der Seite des Stickstoffs bietet und derzeit schon umfassend bearbeitet wird, ist der Austausch der Dithiocarbamat-Grundstruktur gegen eine Dithiocarbazat-Grundstruktur (**355**). Auch ist die Synthese von umgedrehten Aminopiperazin-Derivaten (**356**) denkbar, die wiederum vielseitig derivatisiert werden können und zahlreiche Substanzklassen abdecken, z.B. Hydrazide oder Semicarbazide (**Abb. 151**).

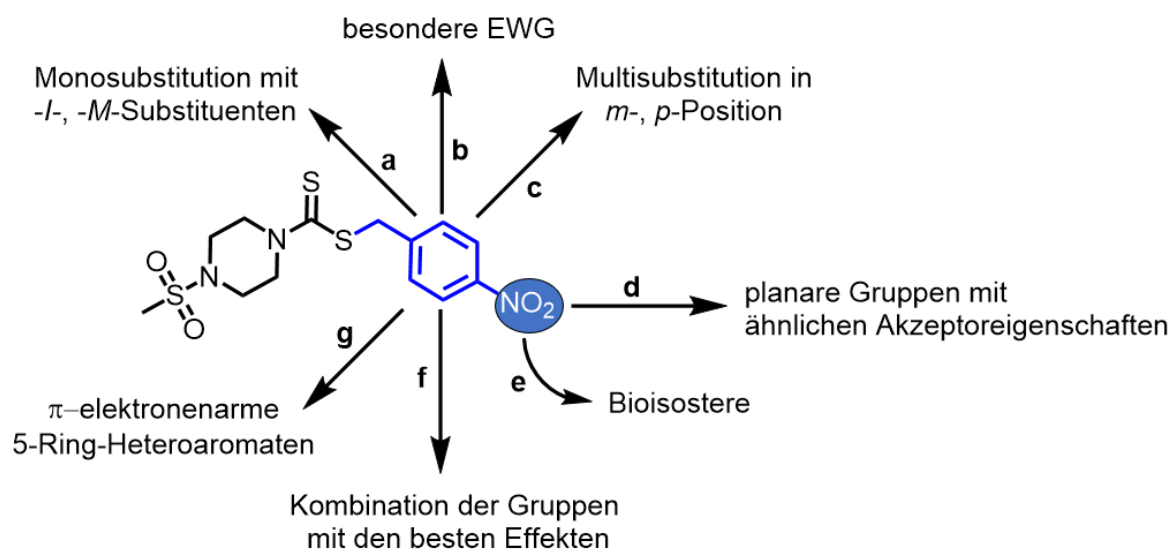


**Abbildung 151:** Mögliche Ansatzpunkte zur Strukturvariation durch Rigidisierung des Dithiocarbamats, Substitution in der Benzyl- oder  $N_\alpha$ -Position

### 3.8 Ersatz der Nitro-Gruppe am Dithiocarbamat-Teilgerüst

Die Nitro-Gruppe in *para*-Position des *S*-Benzylsubstituenten hatte sich in der Arbeit von P. MÄDER als besonders günstig hinsichtlich der antischistosomalen Aktivität erwiesen.<sup>[286]</sup>

Wie in der Einleitung beschrieben, sind durch die Biotransformation der Nitro-Gruppe zahlreiche toxische Produkte zu erwarten. Im Folgenden werden daher Wege beschrieben, die NO<sub>2</sub>-Gruppe zu ersetzen. Hierzu wurden mehrere Strategien ins Auge gefasst, die neben der Mono- und Multisubstitution des Benzylrestes auch dessen Austausch gegen verschiedene Heteroaromaten umfassen. Im Nachfolgenden wird auf jeden einzelnen der in **Abbildung 152** gezeigten Punkte genauer eingegangen.



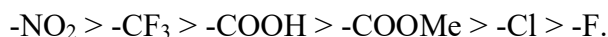
**Abbildung 152:** Strategien zum Ersatz der Nitro-Gruppe

#### 3.8.1 Mono-Substitution am Benzolring mit gewöhnlichen Substituenten

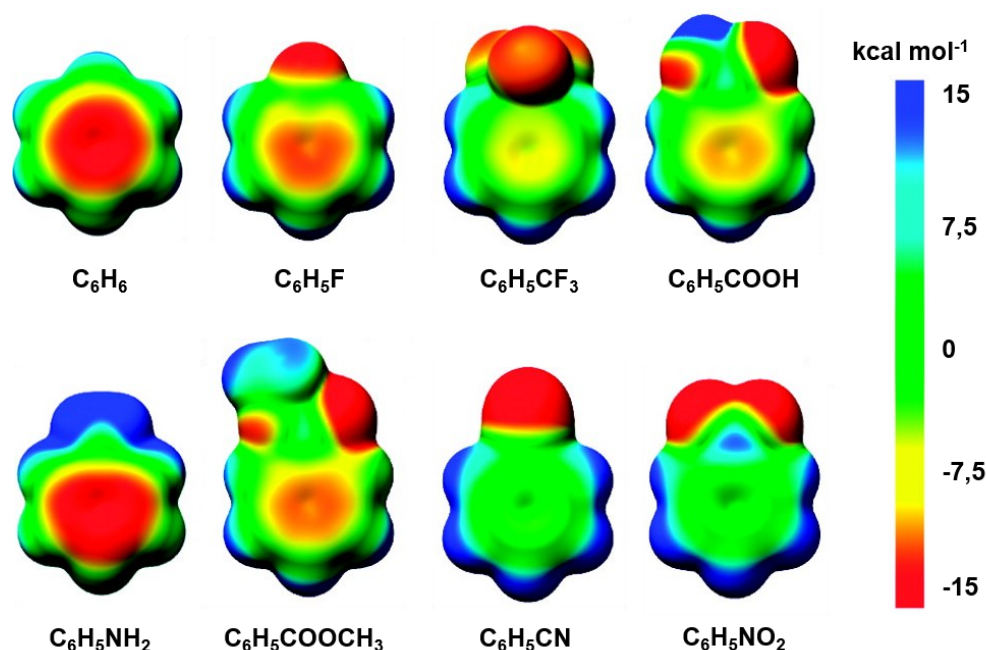
Begonnen wurde damit, die elektronischen Effekte der Nitro-Gruppe nachzuahmen. Diese sollte zunächst durch Monosubstitution gegen andere Gruppen mit ähnlichen elektronischen Eigenschaften ersetzt werden. Genauer handelt es sich dabei um einen -*M*- und einen -*I*-Effekt, die in Kombination einen starken Elektronenzug ausüben und dadurch die Elektronendichte des aromatischen Ringes in besonderer Weise herabsetzen. Dies ermöglicht vor allem π-Elektronenwechselwirkungen mit einem elektronenreichen Aromaten, da hier das HOMO (höchstes besetztes Molekülorbital) des elektronenreichen Donors und LUMO (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital) des elektronenarmen Akzeptors nahe beieinander liegen.

Gruppen mit gleichen Substituenteneffekten stellen Carbonsäure und Carbonsäureester dar. Auch eine Trifluormethylgruppe mit ausschließlich -*I*-Effekt wirkt ebenso elektronenziehend. Fluor- und Chlor-Substituenten mit einem -*I*- und +*M*-Effekt, wobei der -*I*- den +*M*-Effekt jeweils überwiegt, zeigen gleichwohl elektronenziehende Eigenschaften. Im Weiteren fanden

sie anstelle der Nitro-Gruppe am Benzylsubstituenten Verwendung. Dabei lässt sich folgende Abstufung hinsichtlich des Elektronenzuges treffen:

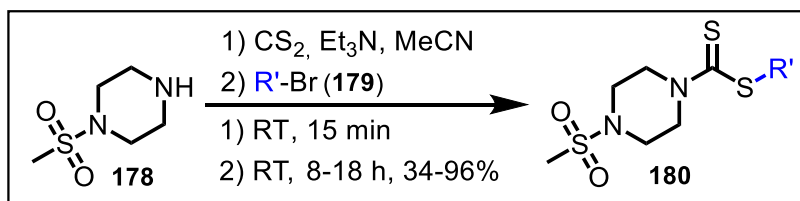


**Abbildung 153** zeigt das elektrostatische Potenzial von unsubstituiertem Benzol sowie das von Anilin, einem substituierten Benzol-Derivat mit *+M*- und *-I*-Effekt, wobei der *M*-Effekt den *I*-Effekt überwiegt. Die Amino-Gruppe ist damit elektronschiebend. Weiterhin werden die elektrostatischen Potenziale (ESP) verschieden substituerter Benzol-Derivate mit elektronenziehenden Substituenten abgebildet. Es wird deutlich, wie die Substituenten Einfluss auf das ESP des aromatischen Rings nehmen und dieses erhöhen bzw. erniedrigen. So gibt es vereinzelt Flächen hoher Elektronendichte und damit negativem ESP (rot) oder elektronenarme Bereiche mit positivem ESP (blau), die von der Gestalt des Substituenten und dessen Fähigkeit abhängen, Elektronen an sich zu ziehen.



**Abbildung 153:** Elektrostatisches Potenzial monosubstituierter Benzol-Moleküle mit elektronschiebenden vs. elektronenziehenden Gruppen im Vergleich zu unsubstituiertem Benzol (modifiziert nach WHEELER *et. al*)<sup>[544]</sup>

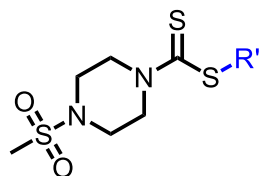
Die Synthese der monosubstituierten Produkte erfolgte, wie auch alle weiteren in diesem Abschnitt gezeigten Verbindungen, gemäß der bekannten Syntheseroute (**Schema 72**). Zum Einsatz kamen, wenn nicht anders erwähnt, kommerziell erhältliche Benzylbromide.



**Schema 72:** One-pot-Reaktion zur Darstellung der monosubstituierten Benzyl-Derivate

Die Ausbeuten der Reaktionen waren durchwachsen und lagen zwischen 34% und 96% (**Tab. 36**).

**Tabelle 36:** Strukturformeln und Ausbeuten der monosubstituierten Benzyllderivate



R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 SchI-33.668	96	 SchI-33.693	64
 SchI-33.676	91	 SchI-33.677	34
 SchI-33.667	58		

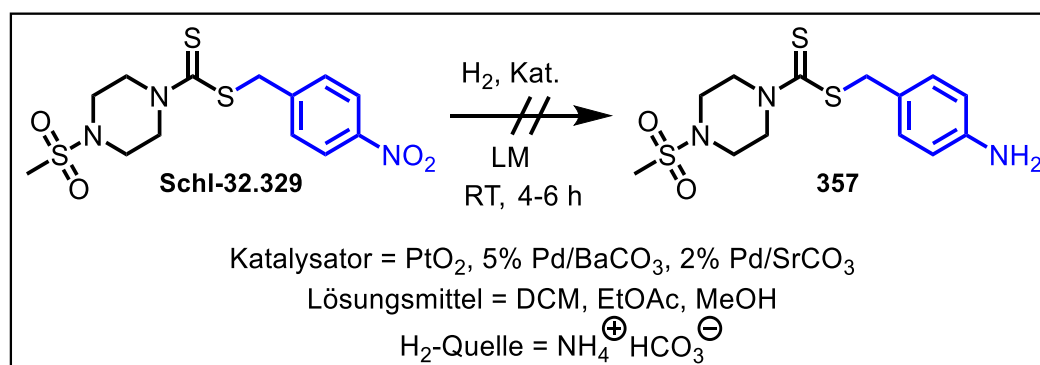
*In vitro* zeigte keines der monosubstituierten Produkte bei 10  $\mu$ M einen signifikanten antischistosomalen Effekt. Auch ein Derivat mit Cyano- (**Schl-33.165**) bzw. Sulfonylmethyl-Gruppe (**Schl-33.001**), die beide als -*M*- und -*I*-Sustituenten einen ähnlichen Elektronenzug wie die Nitro-Gruppe besitzen und damit ebenso als Nitrogruppen-Ersatz in Frage kommen, waren inaktiv. Da sie im Zuge der Synthese der Kombinationsserie 1 entstanden, sind sie hier nicht mehr explizit aufgeführt. Die Ergebnisse der Testung mit den monosubstituierten Derivaten stehen im Widerspruch zu den Erkenntnissen aus der Arbeit von P. MÄDER, in der sich die Substituenten hinsichtlich ihres Potenzials als NO<sub>2</sub>-Ersatz in folgende Reihenfolge bringen lassen:<sup>[286]</sup>



Dabei befand sich jedoch anstelle des 1-(Methylsulfonyl)piperazins noch ein Diethylamin in der Struktur des Dithiocarbamats. Zudem war bei höheren Konzentrationen getestet worden.

Neben den Derivaten mit elektronenziehenden Substituenten sollte auch ein Derivat mit NH<sub>2</sub>-Gruppe (**357**) als mögliches Biotransformationsprodukt dargestellt werden. Dieses besitzt mit einem +*M*- und -*I*-Effekt grundsätzlich andere elektronische Eigenschaften und ist vom Charakter her elektronenschiebend, so dass sich mit diesem Derivat der Einfluss elektronischer

Effekte auf die antischistosomale Aktivität gut überprüfen ließe. Das Nitro-Derivat **Schl-32.329** sollte hierzu in einer katalytischen Hydrierung mit Platin(IV)oxid umgesetzt werden. Während eine Koordination des Katalysators an das Dithiocarbamat und damit eine Inaktivierung dessen befürchtet wurde, führte die Reduktion zu einem undefinierten Produktgemisch, aus dem das gewünschte Produkt nicht isoliert werden konnte. Die Dithiocarbamat-Funktion blieb dabei nicht intakt. Es wurde versucht, das Problem der mangelnden Selektivität durch den Austausch des Katalysatorsystems zu beheben. Unterschiedlich beladene Pd-Katalysatoren, das heißt mit Barium- und Strontiumcarbonat vergiftete Katalysatoren, wurden verwendet, um eine mildere Reaktionsführung zu gewährleisten. Außerdem wurde die Polarität des Lösungsmittels verändert, da Katalysatoren in unterschiedlichen Lösungsmitteln eine andere Aktivität aufweisen können. Neben Methanol fanden Dichlormethan und Ethylacetat Verwendung. Zudem wurde eine Transferhydrierung mit Ammoniumhydrogencarbonat vorgenommen. Unter all diesen Bedingungen konnte aber keine Selektivität erreicht werden (**Schema 73**). Eine Reduktion mit  $\text{SnCl}_2$  wurde nicht vorgenommen, da sich diese Reaktion bereits bei der Darstellung der Aminophenylsulfonyl-Derivate in Kapitel 3.3.1 „Phenylsulfonamid-Derivate mit einem Substituenten in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position“ als nicht kompatibel mit der Dithiocarbamatfunktion herausgestellt hatte. Auch *para*-Aminobenzylbromid, das einen weiteren Zugang zu Verbindung **357** bietet, kommerziell aber nicht erhältlich ist, wurde an dieser Stelle nicht versucht, darzustellen.



**Schema 73:** Gescheiterte Versuche der Reduktion der Nitrogruppe mit Wasserstoff

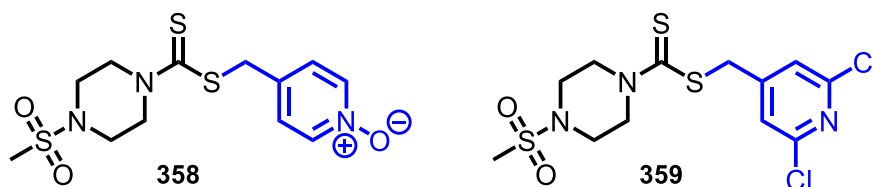
### 3.8.2 Spezielle $\pi$ -Elektronenmangel-Substituenten (EWG's)

#### Pyridyl-Gruppe

Im nächsten Schritt wurde der Austausch des 4-Nitrophenyl-Strukturelements gegen einen Pyridin-Ring forciert. Durch den Einfluss des elektronegativen Stickstoffs ist der Pyridin-Ring ebenfalls elektronenarm und kann wie auch der Nitroaromat gerichtete Wechselwirkungen in Form von H-Brücken und Salzbrücken ausbilden. Der Pyridyl-Ring konnte als 4-(Brommethyl)pyridin-Hydrobromid kommerziell erhalten werden und wurde erfolgreich



zum Dithiocarbamat-Derivat **Schl-33.651** umgesetzt, das nach Reinigung mittels HPLC als Pyridinium-Triflat anfiel. Weiterhin wurde versucht, ein Pyridazin-Derivat ausgehend von Pyridazin-4-carbonsäure darzustellen und damit einen noch stärker elektronenarmen 6-Ring-Heteroaromaten, was allerdings missglückte. Ein Pyridin-*N*-oxid- (**358**) oder 2,6-Dichlor-Pyridin-Derivat (**359**) wären für zukünftige Arbeiten womöglich ebenfalls interessant (**Abb. 154**).



**Abbildung 154:** Mögliche Strukturvarianten mit Pyridin-Ring

### Pentafluorsulfanyl-Rest am Benzolring

Ferner wurde die Nitro-Gruppe -NO<sub>2</sub> auch gegen eine Pentafluorsulfanyl-Gruppe -SF<sub>5</sub> ausgetauscht, die eine gewisse Besonderheit darstellt und somit nachfolgend kurz vorgestellt wird. Ihre Größe liegt zwischen der einer Trifluormethyl- und einer *t*-Butylgruppe:<sup>[545]</sup>

$$\text{Volumen } (t\text{-Butyl}) - \text{Volumen}(-\text{CF}_3) = 34,9 \text{ \AA}^3,$$

$$\text{Volumen } (t\text{-Butyl}) - \text{Volumen } (-\text{SF}_5) = 11,1 \text{ \AA}^3.$$

Die Liganden um das zentrale Schwefelatom nehmen die räumliche Gestalt eines Oktaeders ein. Zudem besitzt die Pentafluorsulfanyl-Gruppe eine hohe Lipophilie. Ihr lipophiler Charakter lässt sich anhand der Lipophiliekonstante  $\pi_X$  beschreiben, die den substituentenbedingten Beitrag zur Lipophilie in Bezug auf ein Grundmolekül wiedergibt und nach HANSCH wie folgt definiert ist:  $\pi_X = \log(P_X/P_H)$ , wobei  $P_X$  und  $P_H$  für die mit der Gruppe X substituierte und die entsprechend unsubstituierte Verbindung stehen. Sie ist über die Verteilungskoeffizienten P im System Octanol/Wasser zugänglich. **Tabelle 37** zeigt die entsprechenden Werte für substituiertes Benzol.

**Tabelle 37:** Lipophilie-Konstanten  $\pi_X$  verschieden substituierter Benzol-Derivate mit Substituent X

X	<i>t</i> -Bu	SCF <sub>3</sub>	SF <sub>5</sub>	OCF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	Cl	CH <sub>3</sub>	F	H	NO <sub>2</sub>
$\pi_X$	1.98	1.44	1.23	1.04	0.88	0.71	0.56	0.14	0	-0.28

Demnach besitzt die Pentafluorsulfanyl-Gruppe eine höhere Lipophilie als eine Trifluormethoxy- und eine Trifluormethyl-Gruppe, ist jedoch weniger lipophil als eine (Trifluormethyl)mercapto-Gruppe.<sup>[546]</sup>

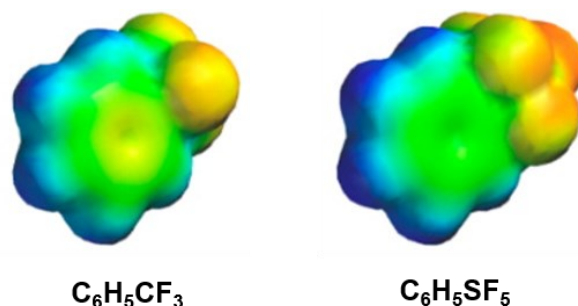
Die Pentafluorsulfanyl-Gruppe ist zudem als sehr stark elektronenziehender Substituent bekannt. Der Vergleich der Dissoziationskonstanten von *meta*- und *para*-substituierter

Benzoessäure in einem Gemisch aus Ethanol/Wasser im Verhältnis von 1:1 bei 25 °C, die in **Tabelle 38** aufgeführt sind, bringt diesen Sachverhalt anschaulich zum Ausdruck. Dies gilt auch für die *Hammett*-Parameter  $\sigma_m$  und  $\sigma_p$ , wobei  $\sigma = \log(K_X/K_H)$  ist.<sup>[546–550]</sup>  $K_H$  steht für die Dissoziationskonstante von Benzoessäure bei 25 °C in Wasser und  $K_X$  für die Dissoziationskonstante eines in *meta*- oder *para*-Position substituierten Benzoessäure-Derivats unter identischen experimentellen Bedingungen.

**Tabelle 38:** Dissoziationskonstanten von *meta*- und *para*-substituierten Benzoessäuren und *Hammett*-Parameter

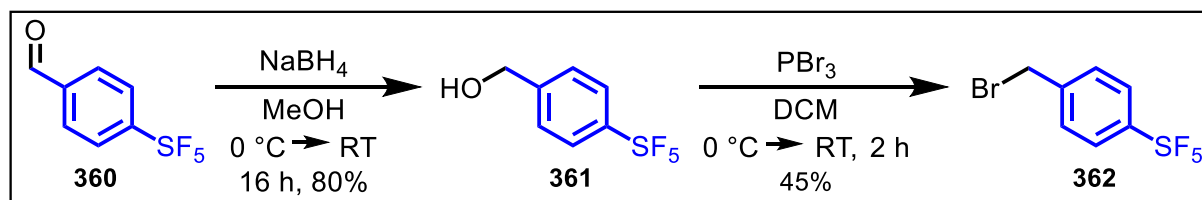
X	pKs ( <i>meta</i> )	pKs ( <i>para</i> )	$\sigma_m$	$\sigma_p$
NO <sub>2</sub>	4.66	4.53	0.73	0.77
SF <sub>5</sub>	4.82	4.70	0.61	0.69
CF <sub>3</sub>	5.11	4.95	0.43	0.53
SCF <sub>3</sub>	5.13	4.98	0.41	0.51
OCF <sub>3</sub>	5.15	5.19	0.39	0.36

Die Pentafluorsulfanyl-Gruppe übt also einen größeren elektronenziehenden Effekt aus als eine Trifluormethoxy-, (Trifluormethyl)mercapto- und eine Trifluormethyl-Gruppe, die in dieser Reihenfolge den Einfluss des +*M*-Effekts zunehmend verlieren bzw. diesen wie bei der CF<sub>3</sub>-Gruppe dann gar nicht mehr besitzen. All das geht einher mit einer Zunahme des Elektronenzuges. Der Vergleich der Dipolmomente von (Pentafluorsulfanyl)benzol (3.44 D) und (Trifluormethyl)benzol (2.60 D) unterstreicht diesen Trend nochmals.<sup>[547]</sup> Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wurde die Pentafluorsulfanyl-Gruppe in der Vergangenheit bereits erfolgreich dazu genutzt, eine Trifluormethyl- eine *t*-Butyl- sowie eine Nitro-Gruppe oder aber ein Halogenatom in einem Molekül adäquat zu ersetzen, was in einem Reviewartikel von SOWAILEH *et al.* umfassend dargestellt wird.<sup>[551]</sup> **Abbildung 155** stellt das elektrostatische Potenzial einer Trifluormethyl- sowie einer Pentafluorsulfanyl-Gruppe und den entsprechenden Einfluss dieser auf einen Phenylrest vergleichend gegenüber. Der stärkere Elektronenzug der SF<sub>5</sub>-Gruppe wird anhand der verminderten Elektronendichte im aromatischen Ring deutlich, der etwas stärker blau bzw. grün eingefärbt ist. Die Elektronendichte an der Stelle des Substituenten hingegen ist sehr hoch und das ESP damit stark negativ, was durch eine Orangefärbung sichtbar wird.



**Abbildung 155:** Elektrostatisches Potenzial eines Trifluormethyl- und Pentafluorsulfanyl-substituierten Benzols (modifiziert nach MATSUZAKI *et. al*)<sup>[552]</sup>

Erste Syntheseveruche (4-(Brommethyl)phenyl)pentafluor- $\lambda^6$ -sulfan darzustellen, wurden mit dem Toluolderivat Pentafluor(*p*-toluoyl)- $\lambda^6$ -sulfan unternommen, das nach einer Vorschrift von MU *et al.* mit Azobis(isobutyronitril) und *N*-Bromsuccinimid in 1,2-Dichlorethan bei 80 °C in einer Radikalreaktion umgesetzt wurde.<sup>[553]</sup> Das gewünschte Benzylbromid **362** konnte jedoch nicht erhalten werden, weshalb im nächsten Schritt 4-(Pentafluor- $\lambda^6$ -sulfanyl)-benzaldehyd (**360**) als Ausgangspunkt für die Synthese gewählt wurde. Der Aldehyd konnte in Analogie zu LEBLEU *et al.* mit Natriumborhydrid in Methanol bei 0 °C in den Alkohol (4-(Pentafluor- $\lambda^6$ -sulfanyl)phenyl)methanol (**361**) überführt werden.<sup>[554]</sup> Die Reduktion, also die nucleophile Hydridübertragung, die durch die Koordination des Natriumions an den Carbonyl-Sauerstoff erleichtert wird, erfolgte dabei in einer guten Ausbeute von 80%. Die Hydroxylgruppe des Benzylalkohols wurde in einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Phosphortribromid in Dichlormethan bei 0 °C anschließend gegen Brom ausgetauscht (**Schema 74**). Da ein Molekül  $\text{PBr}_3$  bis zu drei Hydroxylgruppen umwandeln kann, wobei es in Phosphonsäure übergeht, wurden lediglich 0.35 Äquivalente  $\text{PBr}_3$  bezogen auf den Alkohol eingesetzt, was zusammen mit der Hydrolyselabilität von  $\text{PBr}_3$  die mittlere Ausbeute von 45% erklären könnte.



**Schema 74:** Erfolgreiche Synthesesequenz des Pentafluorsulfanyl-Derivats aus 4-(Pentafluor- $\lambda^6$ -sulfanyl)-benzaldehyd

### (Trifluormethyl)sulfonyl-Rest am Benzolring

Da sich in der Arbeit von P. MÄDER neben der Nitro-Gruppe auch eine Sulfonylmethyl-Gruppe in der 4-Position des Benzylsubstituenten als günstig hinsichtlich der antischistosomal Aktivität erwiesen hatte, sollte deren Elektronenzug im Weiteren nun durch den Austausch des *+I*-Substituenten  $-\text{CH}_3$  gegen den *-I*-Substituenten  $-\text{CF}_3$  erhöht werden, wenngleich die Sulfonyl-Gruppe ( $-\text{SO}_2\text{R}$ ) in ihrer Gesamtheit einen *-M*- und *-I*-Substituent darstellt.<sup>[286]</sup>

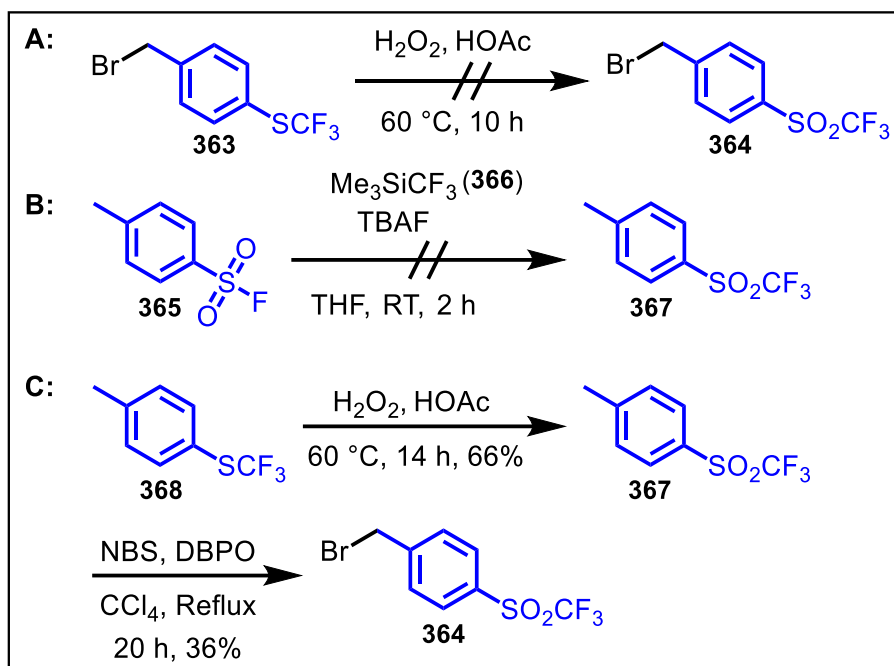
**Tabelle 39** zeigt, wie sich mit jeder Erhöhung der Oxidationsstufe am Schwefelatom der elektronenziehende Charakter kontinuierlich steigert.<sup>[550]</sup> Angefangen beim Thioether -SCF<sub>3</sub> (+*M*- und -*I*-Effekt) nimmt der Elektronenzug über das Sulfoxid -SOCF<sub>3</sub> bis zum Sulfon -SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (-*M*- und -*I*-Effekt) deutlich zu. Dies wird durch einen sinkenden pK<sub>s</sub>-Wert an einer mit der jeweiligen Gruppe substituierten Benzoesäure sichtbar und ist auch darauf zurückzuführen, dass mit jedem weiteren Sauerstoff-Atom die Anzahl möglicher mesomerer Grenzformeln steigt. Anschaulich wird, welchen Einfluss der Austausch von -CH<sub>3</sub> gegen -CF<sub>3</sub> auf die Säurestärke und damit den Elektronenzug hat. Die mit der SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>-Gruppe substituierte Benzoesäure übertrifft letztlich sogar die mit einer NO<sub>2</sub>-Gruppe substituierte Benzoesäure in ihrer Acidität.

**Tabelle 39:** Vergleich der Dissoziationskonstanten und *Hammett*-Parameter *meta*- und *para*-substituierter Benzoesäuren mit SCF<sub>3</sub>-, SOCF<sub>3</sub>- und SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>-Gruppe

X	pK <sub>s</sub> ( <i>meta</i> )	pK <sub>s</sub> ( <i>para</i> )	σ <sub>m</sub>	σ <sub>p</sub>
SO <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	4.54	4.24	0.80	0.96
NO <sub>2</sub>	4.66	4.53	0.73	0.77
SOCF <sub>3</sub>	4.74	4.65	0.67	0.73
SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4.78	4.68	0.60	0.72
SOCH <sub>3</sub>	4.97	5.01	0.50	0.48
SCF <sub>3</sub>	5.13	4.98	0.41	0.51
SCH <sub>3</sub>	5.53	5.74	0.13	-0.01

Zur Einführung der (Trifluormethyl)sulfonyl-Gruppe am Aromaten wurden mehrere Synthesestrategien verfolgt. Zunächst wurde versucht, aus (4-(Brommethyl)phenyl)-(trifluormethyl)sulfan (**363**) mit Wasserstoffperoxid in Essigsäure das entsprechende Sulfon **364** zu erhalten. Nach YAO *et al.*, die eine vergleichbare Oxidation von Bis(4-(Brommethyl)phenyl)sulfan unter denselben Reaktionsbedingungen beschrieben haben, sollte dabei das Benzylbromid intakt bleiben.<sup>[555]</sup> In diesem Fall konnte jenes aber nicht erfolgreich isoliert werden (**Schema 75, A**). Daher wurde 4-Methylbenzolsulfonylfluorid (**365**) als Ausgangssubstanz der Synthese gewählt. In einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit dem *Rupperts*-Reagenz (**366**) sollte dieses nach einer Vorschrift von KOLOMEITSEV *et al.* in 1-Methyl-4-((trifluormethyl)sulfonyl)benzol (**367**) überführt werden.<sup>[556]</sup> Der Mechanismus verläuft dabei Fluoridionen-katalysiert unter Bildung von Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>F und dem hochreaktiven Intermediat [CF<sub>3</sub>]<sup>-</sup> (Trifluormethid). Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran mit Tetrabutylammoniumfluorid als Katalysator konnte jedoch kein Umsatz festgestellt werden (**Schema 75, B**). Weitere Versuche mit längeren

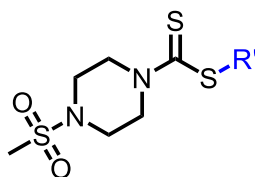
Reaktionszeiten führten auch zu keinem Erfolg. Die Synthese ausgehend von *p*-Tolyl-(trifluormethyl)sulfan (**368**) nach einer Vorschrift von GOUMONT *et al.* durch Oxidation und radikalische Bromierung war letztlich erfolgreich (**Schema 75, C**).<sup>[557]</sup>



**Schema 75:** Erprobte Syntheserouten zur Darstellung des Trifluormethylsulfonyl-Derivats **364**

Die dargestellten Bromide wurden schließlich ebenfalls zu den Dithiocarbamat-Derivaten umgesetzt (**Tab. 40**).

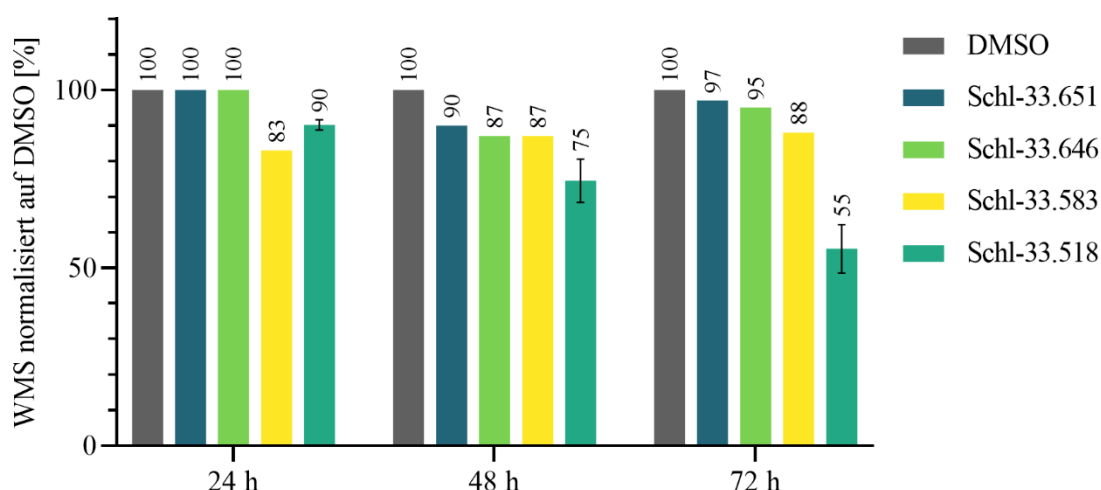
**Tabelle 40:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten der Derivate mit besonderen EWG's (*electron withdrawing groups*) (\* Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



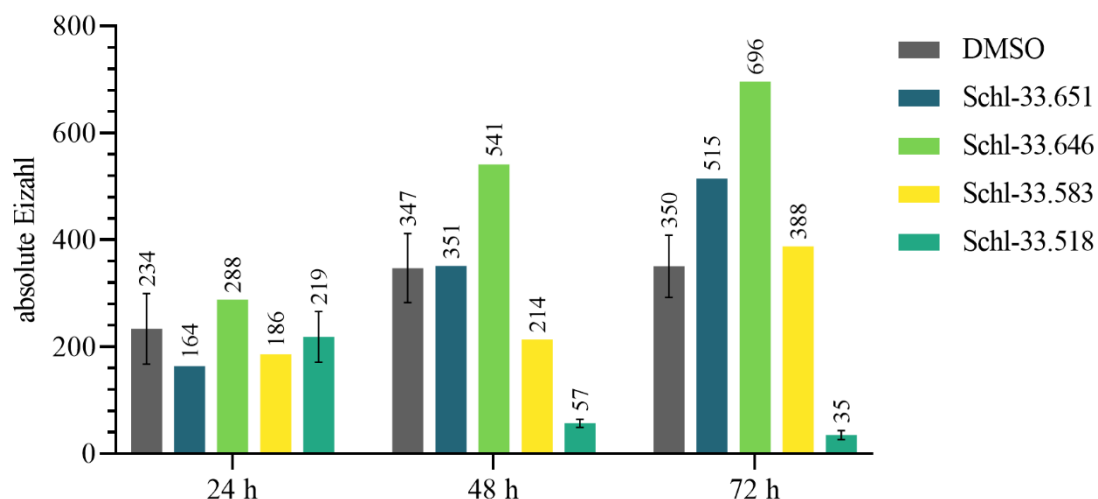
R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 SchI-33.651	58	 SchI-33.583	92
 SchI-33.646	33*	 SchI-33.518	15*

Auch das für die Synthese des Trifluormethylsulfonyl-Derivats **364** verwendete (4-(Brommethyl)phenyl)(trifluormethyl)sulfan (**363**) wurde in das entsprechende Dithiocarbamat-Derivat **Schl-33.583** überführt.

*In vitro* zeigte nur das (Trifluormethyl)sulfonyl-Derivat **Schl-33.518** eine antischistosomale Aktivität (**Abb. 156+157**). Während die Paarungsstabilität und damit auch die Eizahl bereits nach 48 h deutlich beeinflusst wurden, war ein ebenso großer Effekt auf die Motilität erst nach 72 h sichtbar. Diese wurde um etwa 45% reduziert. Zudem traten nach 72 h vereinzelt schwache Tegumentschäden auf. Die Eizahl nach 48 h lag unterhalb von 60 Eiern und nach 72 h bei 35 Eiern. **Schl-33.518** war bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch gegenüber der HepG2-Zelllinie.



**Abbildung 156:** Wurm-Motilität der Derivate mit besonderen EWG's bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 157:** Absolute Eizahlen der Derivate mit besonderen EWG's bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden

Der resultierende Verlust an Aktivität für das 4-Pyridylmethyl-Derivat **Schl-33.651** könnte zwei wesentliche Gründe haben: Entweder nahm durch den während der Aufarbeitung protonierten Pyridyl-Rest die Absorption stark ab oder es ist außer einer geringen Elektronendichte im aromatischen Ring noch zusätzlich eine gerichtete Wechselwirkung in Form eines Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptors für die Aktivität essentiell. Der Pyridin-

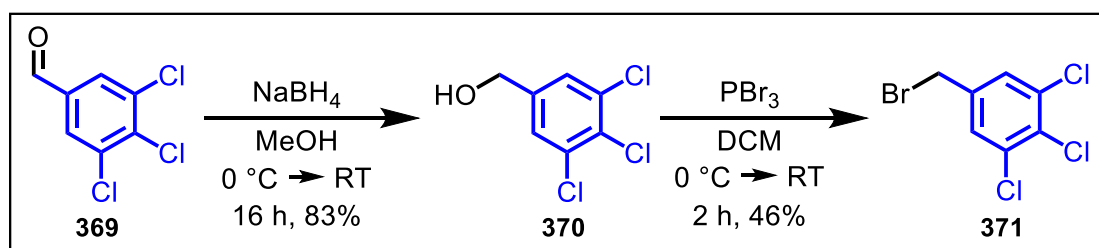
Rest besitzt in der protonierten Form jedoch kein freies Elektronepaar und fungiert damit folglich nicht als H-Brückenakzeptor. Da das Pyridiniumion mit einem  $pK_S = 5,5$  eine mittelstarke Säure ist, reagiert sie im wässrigen jedoch unter Protonenabgabe, sodass sich dieser Umstand zumindest teilweise aufhebt und damit vermutlich eher eine untergeordnete Rolle spielt. Vergleicht man das (Trifluormethyl)sulfonyl-Derivat **Schl-33.583** mit dem Pentafluorsulfanyl-Derivat **Schl-33.518**, so lässt sich sagen, dass beide stark elektronenziehende Substituenten aufweisen, wobei die (Trifluormethyl)sulfonyl-Gruppe den elektronenziehenden Effekt der Pentafluorsulfanyl-Gruppe überwiegt. Die (Trifluormethyl)sulfonyl-Gruppe ist im Gegensatz zu der Pentafluorsulfanyl-Gruppe (vernachlässigt man die schwach ausgeprägten Wasserstoffbrücken-Bindungs-Eigenschaften eines F-Substituenten, die eher eine untergeordnete Rolle spielen einmal) zusätzlich ein potenzieller H-Brückenakzeptor. Die Aktivität der Dithiocarbamat-Derivate scheint daher, soweit das an dieser Stelle zu beurteilen ist, nicht ausschließlich auf den elektronischen Eigenschaften der Nitro-Gruppe zu beruhen. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der mono-substituierten Derivate der **Tabelle 36** (S. 229) unterstützt. Die unterschiedliche räumliche Einflussnahme der Substituenten wurde an dieser Stelle gänzlich außer Acht gelassen, könnte aber insbesondere im Fall der Pentafluorsulfanyl-Gruppe von besonderer Bedeutung sein, da deren starre Anordnung einen relativ großen Platz beansprucht.

### 3.8.3 Multisubstitution am Benzolring mit Halogenatomen

In dieser Arbeit wurde die Nitro-Gruppe nicht nur durch den Austausch eines hinsichtlich der elektronischen Eigenschaften vergleichbaren Substituenten, also durch Monosubstitution, ersetzt. Die Elektronendichteverteilung des Aromaten wurde ebenso durch mehrere elektronenziehende Gruppen verändert und damit durch Multisubstitution (**Tabelle 41**). Die dabei eingeführten Gruppen sollten größenbedingt vorwiegend Fluoratome sein. Ebenso sollten sich diese vorwiegend in der *meta*- oder *para*-Position befinden, was anhand der resultierenden elektrischen Dipolmomente erklärt werden kann. Betrachtet man die durch die unterschiedlichen Elektronegativitäten hervorgerufenen Polaritäten der einzelnen Bindungen und die damit verbundene räumliche Ladungstrennung, so ist die negative Teilladung jeweils am elektronegativen Fluor konzentriert, wohingegen die positive Teilladung an den Kohlenstoffatomen lokalisiert ist. Die ungleichmäßige Ladungsverteilung, das heißt das Auftreten zweier Pole mit jeweils unterschiedlichem Vorzeichen, wird durch das elektrische Dipolmoment  $\vec{\mu}$  charakterisiert, das als skalares Produkt aus der Ladung  $q$  und dem Abstand  $\vec{l}$  der Ladungsschwerpunkte definiert ist gemäß  $\vec{\mu} = q \cdot \vec{l}$ . Es handelt sich also um eine vektorielle Größe, die nach Konvention in Richtung der positiven Ladung orientiert ist. In der

Lewis-Struktur eines Moleküls wird dagegen häufig ein elektrischer Dipol durch einen Pfeil dargestellt, dessen Spitze das negative Ende markiert, die Richtung des Pfeils also entgegengesetzt zu der des Vektors  $\vec{\mu}$  verläuft. Beim Benzyl-Rest mit jeweils einem Fluor-Substituenten in den beiden *meta*-Positionen ergibt sich das Gesamtdipolmoment, also der gerichtete Dipol, nach Vektoraddition der einzelnen Dipolmomente. Es ist in Richtung der *para*-Position orientiert, was einem elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position gleichkommt. Ein zusätzlicher Substituent in *meta*-Position verursacht demnach ein noch größeres Dipolmoment in Richtung der *para*-Position und damit verbunden einen noch größeren Elektronenzug. Außer einem 3,5-Difluorbenzyl- (**Schl-33.582**) und einem 3,4,5-Trifluorbenzyl-Derivat (**Schl-33.510**) wurde auch ein Pentafluorbenzyl-Derivat (**Schl-33.569**) dargestellt, das ein mit einem *para*-Monofluorbenzyl-Derivat vergleichbares Gesamtdipolmoment aufweist. Infolge der Symmetrieverhältnisse addieren sich hier die Einzel-Dipolmomente der Substituenten in *ortho*- und *meta*-Position zu einem Gesamtdipolmoment von  $\vec{\mu} = 0$ , heben sich also gegenseitig auf. Ein 3,5-Bis(trifluormethyl)benzyl-Derivat (**Schl-33.509**), das ebenso dargestellt wurde, ist von einer Aufhebung einzelner Bindungsmomente indessen nicht betroffen, was darauf zurückzuführen ist, dass die  $\text{CF}_3$ -Gruppen eine tetraedrische Geometrie besitzen. Das Gesamtdipolmoment ist somit in etwa mit dem des 3,4,5-Trifluorbenzyl-Derivats vergleichbar. Abschließend wurde auch noch ein 3,4,5-Trichlorbenzyl-Derivat (**Schl-33.670**) dargestellt. Aufgrund der geringeren Elektro-negativität von Chlor gegenüber Fluor sind hier die Einzeldipolmomente und damit auch das Gesamtdipolmoment kleiner, weshalb es gegenüber dem 3,4,5-Trifluorbenzyl-Derivat (unter Vernachlässigung des +*M*-Effekts) schwächer elektronziehend ist. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass bei dieser Betrachtungsweise nur elektronische Effekte eine Rolle spielen. Die Ladung wird als punktförmig angesehen, sterische Effekte bleiben unberücksichtigt.

Während die mehrfach-fluorierten Benzylbromide im Allgemeinen kommerziell erhältlich waren, musste das 3,4,5-Trichlorbenzylbromid (**371**) zunächst synthetisch erschlossen werden (**Schema 76**).

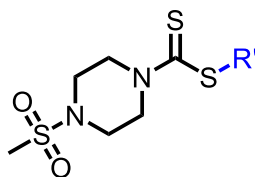


**Schema 76:** Synthesesequenz zur Darstellung von 3,4,5-Trichlorbenzylbromid aus dem entsprechenden Benzaldehyd



Die Synthese ging von 3,4,5-Trichlorbenzaldehyd (**369**) aus, das (wie auch schon beim Pentafluorsulfanyl geschehen) zum Benzylalkohol (**370**) reduziert und sodann bromiert wurde.

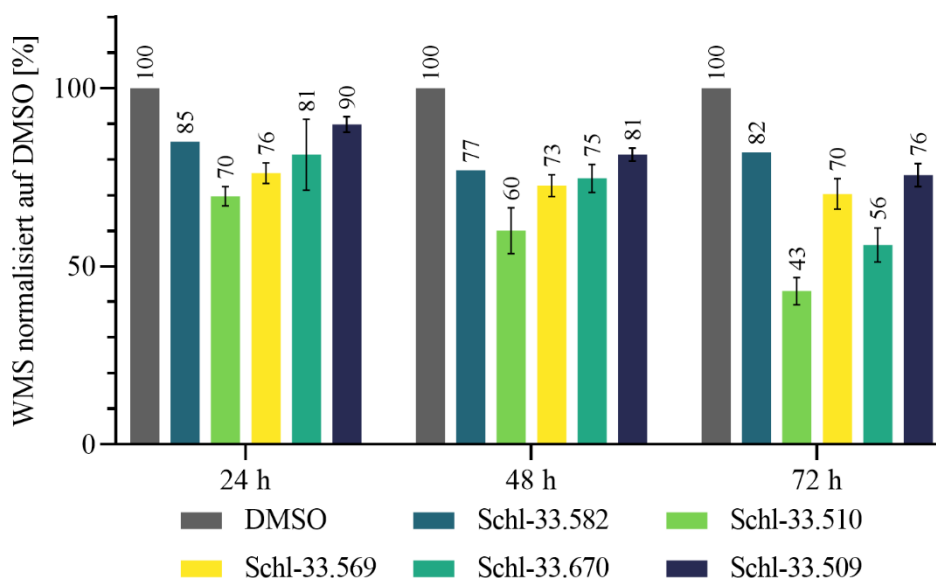
**Tabelle 41:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten der mehrfach-substituierten Benzyl-Derivate (\* Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



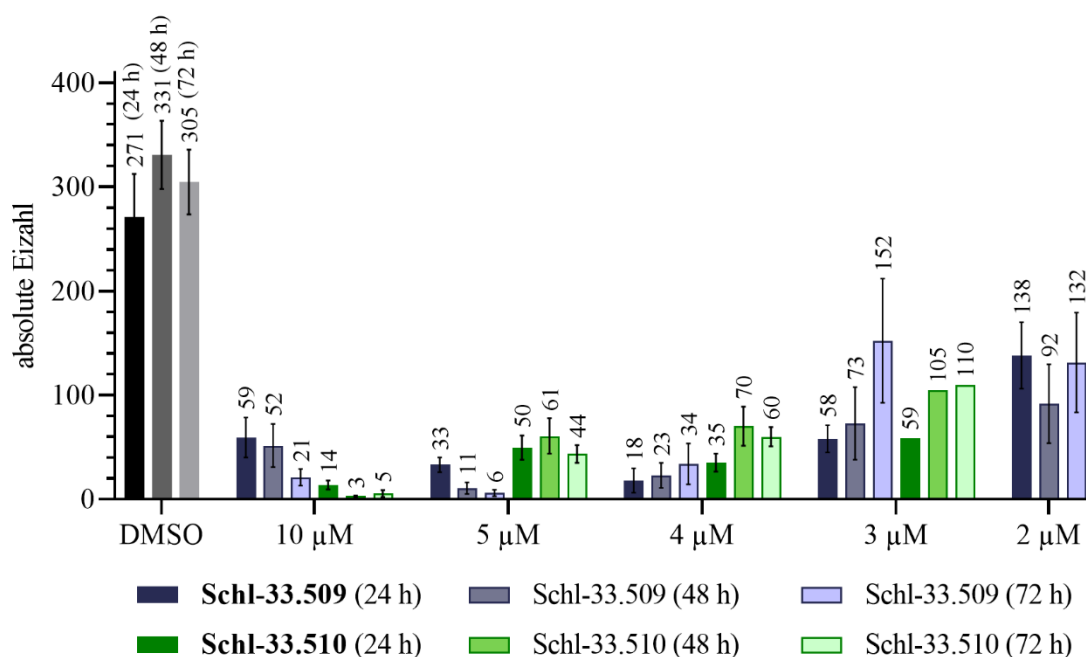
R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.582</b>	49	 <b>Schl-33.509</b>	77
 <b>Schl-33.510</b>	89	 <b>Schl-33.670</b>	27*
 <b>Schl-33.569</b>	86		

*In vitro* war das disubstituierte Fluor-Derivat **Schl-33.582** inaktiv. Alle anderen multi-substituierten Derivate zeigten eine schwache antischistosomale Aktivität. Das pentafluorsubstituierte Derivat **Schl-33.569** führte bei 10  $\mu\text{M}$  zu einer 50% Entpaarung und einem 30%-igen Rückgang der Motilität (**Abb. 158**). Auch die Eiproduktion wurde in Teilen beeinflusst. Zudem traten vereinzelt schwache Darmdilataionen auf. Das 3,4,5-Trifluorbenzyl-Derivat **Schl-33.510** war für eine vollständige Entpaarung und annähernd vollständige Reduktion der Eiproduktion nach bereits 48 h beziehungsweise 24 h verantwortlich. Es führte zu mittleren Tegumentschäden und vereinzelt schwachen Darmdilataionen. Die Motilität reduzierte es über 72 h um etwa 55%. Während es die Paarungsstabilität bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  beeinflusste, nahm es auf die Eiproduktion und die Motilität auch bei 4  $\mu\text{M}$  noch leichten Einfluss (**Abb. 159**). So wurden nach 72 h nur noch 60 Eier gezählt und auch die Motilität ging weiterhin um bis zu 40% zurück. Verglichen mit dem Chlor-

Derivat **Schl-33.670**, das unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  unauffällig blieb, war es, bezüglich Darmdilationen zwar etwas schwächer wirksam, jedoch beeinflusste es alle anderen Parameter dafür etwas früher. Hinsichtlich der Paarungsstabilität war es innerhalb von 72 h insgesamt doppelt so aktiv; auch bei der Motilität gab es einen Unterschied von etwa 15%. Das 3,5-Bis(trifluormethyl)benzyl-Derivat **Schl-33.509** hatte keinen signifikanten Effekt auf die Motilität und bildete bei 10  $\mu\text{M}$  auch nur leichte Phänotypen in Form von Darmdilationen an den Weibchen aus. Die Paarungsstabilität wurde jedoch bis zu einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  und die Eiproduktion bis zu 4  $\mu\text{M}$  deutlich inhibiert.

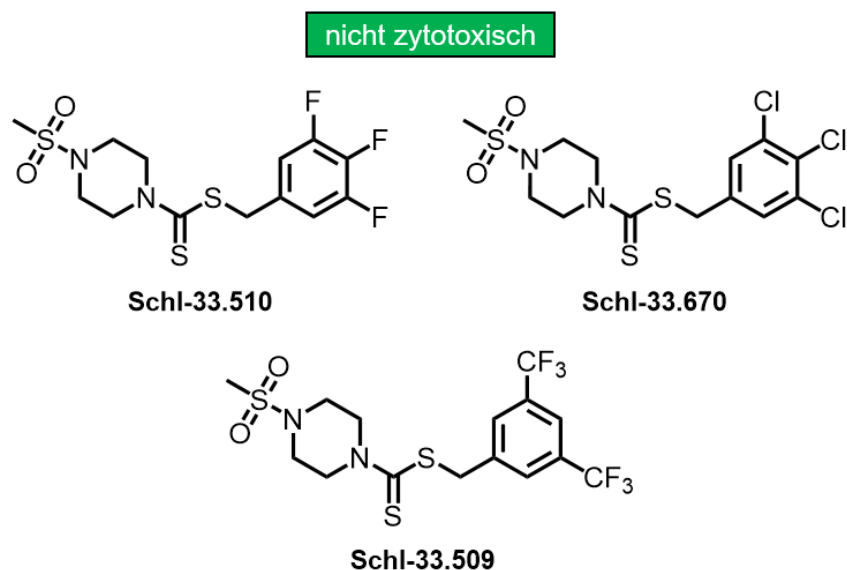


**Abbildung 158:** WMS der multi-substituierten Benzyl-Derivate nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu\text{M}$



**Abbildung 159:** Vergleich der absoluten Eizahlen des 3,5-Bis(trifluormethyl)benzyl- und des 3,4,5-Trifluorbenzyl-Derivats bei verschiedenen Konzentrationen

Während das trisubstituierte Chlor-Derivat **Schl-33.670** bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch auf HepG2-Zellen wirkte, tat das entsprechende Fluor-Derivat **Schl-33.510** dies nur bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (**Abb. 160**). **Schl-33.509** mit den beiden Trifluormethyl-Gruppen war sowohl gegenüber der HepG2-Zelllinie als auch der LS174T-Zelllinie nicht zytotoxisch.

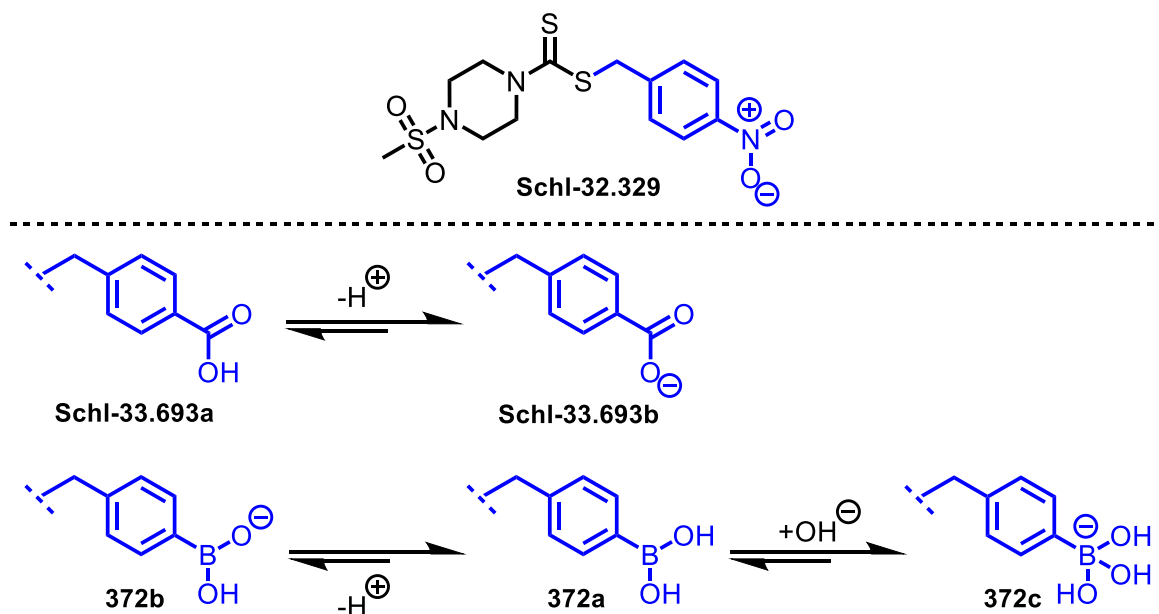


**Abbildung 160:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.510** bei 50  $\mu\text{M}$  und von **Schl-33.670/509** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie

### 3.8.4 Planare Gruppen mit NO<sub>2</sub>-ähnlichen Akzeptor-Eigenschaften

Auch die räumliche Anordnung der Nitrogruppe wurde bei den Austauschversuchen genauer betrachtet; Gleiches gilt für die Fähigkeit, H-Brücken auszubilden. Es wurde angenommen, dass der Ersatz der Nitro-Gruppe durch eine Gruppe mit gleicher geometrischer Gestalt und ähnlichen H-Brücken-Donor- beziehungsweise -Akzeptor-Eigenschaften ebenso aktiv sein könnte. Außer der Nitro-Gruppe, die eine trigonal-planare, also dreieckig flache Struktur mit einem Bindungswinkel von 120° aufweist, zeigen auch eine Carbonsäure- und Boronsäurefunktion dieselbe Gestalt. Während die Nitro-Gruppe mit ihren beiden Sauerstoff-Atomen zwei H-Brücken-Akzeptoren bereitstellt, also tendenziell zur Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken befähigt ist, sind die Wasserstoffbrückenbindungs-Eigenschaften einer Carbonsäure und Boronsäure pH-Wert abhängig. Die Carbonsäure, die sowohl einen H-Brücken-Donator als auch -Akzeptor besitzt, liegt unter physiologischen Bedingungen überwiegend deprotoniert und damit in Form von Carboxylat-Anionen vor und besitzt damit ebenso zwei Wasserstoffbrücken-Akzeptoren. Bei der Boronsäure ist die Lage etwas komplizierter. Die Boronsäure besitzt mit zwei freien OH-Gruppen in der Summe zwei H-Brücken-Donatoren sowie zwei -Akzeptoren. Sie liegt mit einem pK<sub>S</sub>-Wert von etwa 9 weitestgehend protoniert vor. Jedoch stellt die Boronsäure mit ihrem Elektronensextett am

Boratom auch eine Elektronenmangelverbindung dar, weshalb sie als Lewisäure Boronatkomplexe ausbildet, deren  $pK_s$ -Wert wiederum bei etwa 7 liegt. In dieser Form verfügt sie dann insgesamt über drei H-Brücken-Donatoren sowie drei -Akzeptoren und ist der Nitro-Gruppe damit eher konträr (**Abb. 161**).



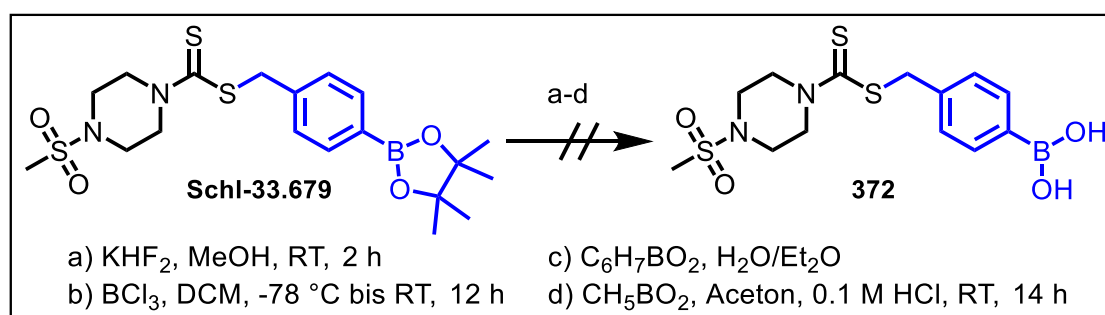
**Abbildung 161:** Strukturformeln des Nitro-, Carbonsäure- und Boronsäure-Derivats und deren Protonierungsgrade (**372b** stellt eher die Ausnahme dar)

Von den Eigenschaften zur Ausbildung einer H-Brücke ist die Nitro-Gruppe beispielsweise auch einer Phosphinsäure mit einem  $pK_s$ -Wert von etwa 2 ähnlich, deren räumliche Anordnung aber der eines Tetraeders gleicht.

Das Phenylboronsäure-Derivat **372** wurde zunächst aus 4-Brommethylphenylboronsäure dargestellt, konnte aber nach mehreren Versuchen nicht sauber erhalten werden. Die einzige Möglichkeit, die damit bleibt, ist die der Einführung der Boronsäure auf der letzten Stufe einer Synthesesequenz, in welcher zunächst ein Dithiocarbamat mit einem *para*-Brombenzyl-Rest entsteht. Es folgt eine *Grignard*-Reaktion mit einem Borsäureester oder anstelle von Magnesium eine Lithium-vermittelte Reaktion. Das entstandene Benzylboronsäureester-Derivat wird schließlich hydrolytisch gespalten. Da hierbei zugleich ein Angriff des Metallorganyls auf das Dithiocarbamat wahrscheinlich ist, wurde dieser Ansatz jedoch nicht verfolgt. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte das 4-Brommethylphenylboronsäure-Derivat dann allerdings als Boronsäurepinakolester erhalten werden, woraufhin sich das Boronsäureester-Derivat **Schl-33.679** darstellen ließ.

Die Entschützung stellte sich allerdings als nicht trivial heraus. So wurden mehrere Methoden der Esterspaltung ausprobiert. Zunächst wurde dies mit Kaliumhydrogendifluorid in Methanol bei Raumtemperatur und darauffolgender wässriger Aufarbeitung des entstandenen

Trifluorborats nach einer Vorschrift von INGLIS *et al.* versucht.<sup>[558]</sup> Auch wurde die Spaltung des Esters nach JEGO *et al.* mit Bortrichlorid bei -78 °C in Dichlormethan vorgenommen.<sup>[559]</sup> In beiden Fällen wurden die harschen Reaktionsbedingungen vom Dithiocarbamat nicht geduldet und es kam zur Zersetzung. Eine mildere, zweiphasige Reaktionsführung mit Phenylboronsäure in einem Gemisch aus dest. Wasser und Diethylether nach COUTTS *et al.* scheiterte vermutlich aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Boronsäureesters.<sup>[560]</sup> In einer einphasigen Reaktion mit Aceton als Lösungsmittel und Methylboronsäure unter leicht sauren Bedingungen nach HINKES *et al.* konnte der Ester durch Umesterung und Bildung des flüchtigen Nebenprodukts 2,4,4,5,5-Pentamethyl-1,3,2-dioxaborolan gespalten werden.<sup>[561]</sup> Jedoch wurde auch auf diesem Wege das Produkt selbst nach säulenchromatographischer Reinigung nicht sauber erhalten, was möglicherweise auch auf eine Zersetzung an Kieselgel zurückzuführen ist (**Schema 77**).

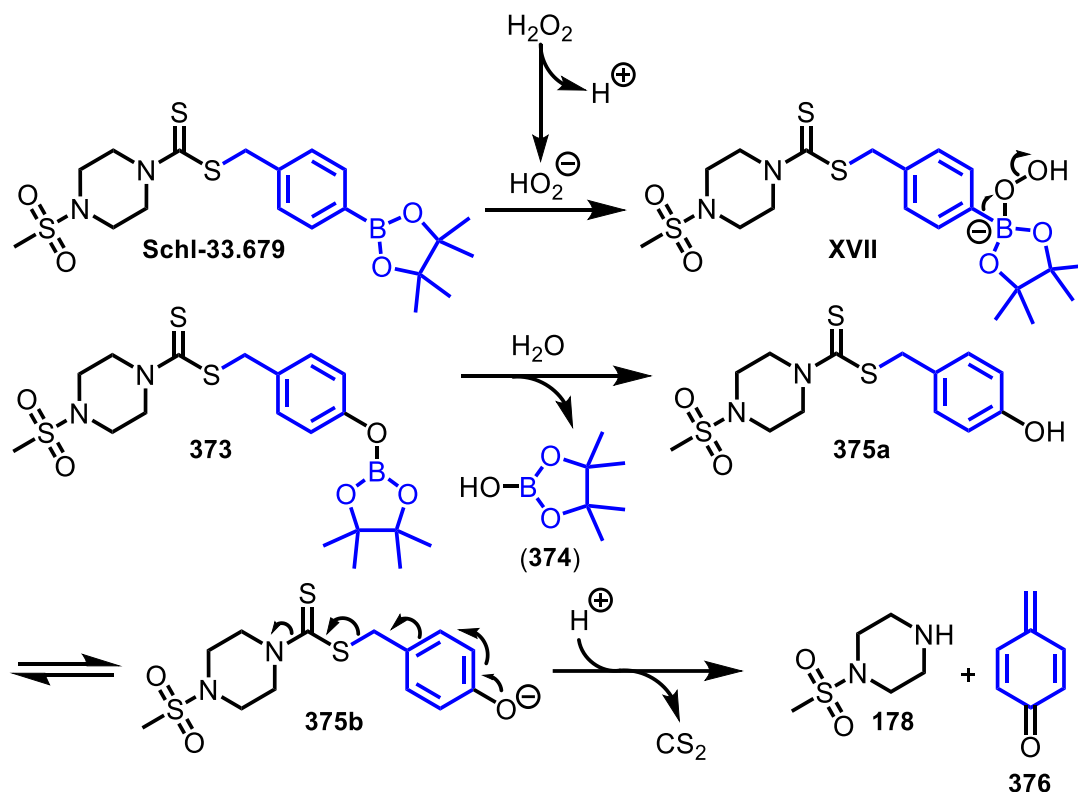


**Schema 77:** Gescheiterte Syntheseversuche zur Spaltung des Boronsäurepinakolester-Derivats **Schl-33.679**

So konnte letztlich nur der Boronsäurepinakolester **Schl-33.679** einer *in-vitro*-Testung unterzogen werden. Dieser kommt einem *Prodrug* gleich, kann er doch durch eine Esterase in die freie Säure überführt werden. Ferner können Boronsäureester durch oxidative Sauerstoffspezies aktiviert werden (**Schema 78**).<sup>[562,563]</sup> Nach nucleophilem Angriff von  $\text{HO}_2^-$  auf das elektrophile Bor-Atom kommt es dabei im ersten Schritt der Reaktion zur Bildung von Addukt **XVII**. Es folgt eine Umlagerung und Bildung eines intermediären Boronats (**373**). Dieses hydrolysiert schließlich und es entstehen ein Borsäurepinakolester (**374**) und das *para*-Phenol-Derivat **375**. Unter physiologischen Bedingungen liegt dieses teilweise deprotoniert als Phenolat (**375b**) vor. Das Phenolat seinerseits geht eine 1,6-Eliminierung zum *para*-Chinon-Methid **376** ein. Die gleichzeitig gebildete Dithiocarbamidsäure zerfällt unter Freisetzung von Kohlenstoffdisulfid und 1-(Methylsulfonyl)piperazin (**178**).

Ein ähnlicher Mechanismus lässt sich auch für die Derivate mit Nitro-Gruppe formulieren und wurde in der Einleitung am Beispiel von Evofosfamid (**141**; **Schema 21**) diskutiert. Hier führt eine bioreduktive Aktivierung zunächst zur Bildung eines Hydroxylamin-Derivats. Da sich die metabolischen Produkte einander gleichen und für die antischistosomale Wirkung der

Dithiocarbamate verantwortlich sein könnten, schien die Testung des Derivats mit Pinakolester durchaus sinnvoll.

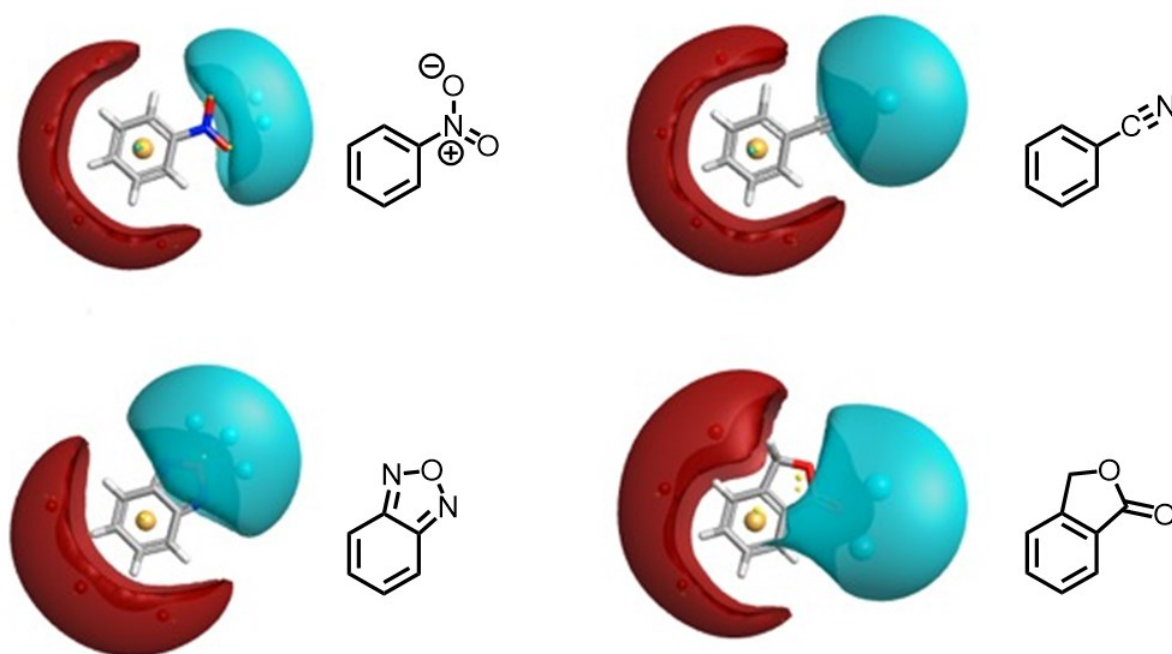


**Schema 78:** Reaktionsmechanismus der Oxidation des Benzylboronsäurepinakolesters **Schl-33.679** mit Wasserstoffperoxid

*In vitro* entfaltete der Benzylboronsäurepinakolester **Schl-33.679** allerdings keine Wirkung, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass der Pinakolester keiner metabolischen Transformation unterlag und damit Folgereaktionen nicht stattfanden oder aber die Ausbildung von H-Brücken nicht ausschließlich für die Wirksamkeit verantwortlich ist. Wasserstoffbrücken, die eine anziehende Wechselwirkung eines kovalent gebundenen Wasserstoffatoms mit einem freien Elektronenpaar eines Atoms einer Atomgruppierung darstellen, lassen sich nicht nur für die Boronsäure formulieren, sondern auch für den Boronsäureester. Da der Ester mit seinen Sauerstoffatomen als Elektronenpaar-Donator dient, ist er der Nitro-Gruppe gar am ähnlichsten. Jedoch könnte in diesem Fall auch der sperrige Di-*tert*-Glykol-Rest für die nicht aufgetretene Aktivität verantwortlich sein, da ein mögliches Target dem benötigten Platz nicht gerecht wurde. Eine andere Wahl wäre beispielsweise ein Boronsäuredimethylester. Andererseits sollten auch ein Acylphenolester- oder ein Phenylhydroxylamin-*O*-sulfonsäureester-Derivat zur Bildung des *para*-Chinon-Methids **376** führen.

### 3.8.5 Bioisostere

Eine weitere Strategie die 4-Nitrobenzyl-Gruppe zu ersetzen, ist ihr Austausch gegen Bioisostere, also Gruppen mit identischer Molekülform und Volumen sowie ungefähr gleicher Verteilung der Elektronen. Diese sollten zudem ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen und eine biologisch vergleichbare Wirkung *in vivo* zeigen. Dies sind neben einer 4-Cyanbenzyl-Gruppe, ein Benzo[c]-1,2,5-oxadiazol-Derivat und ein Isobenzofuran-1(3*H*)-on-Derivat. Die nachfolgende **Abbildung 162** veranschaulicht die elektrostatischen Felder der jeweiligen Reste, die sich einander stark ähneln.

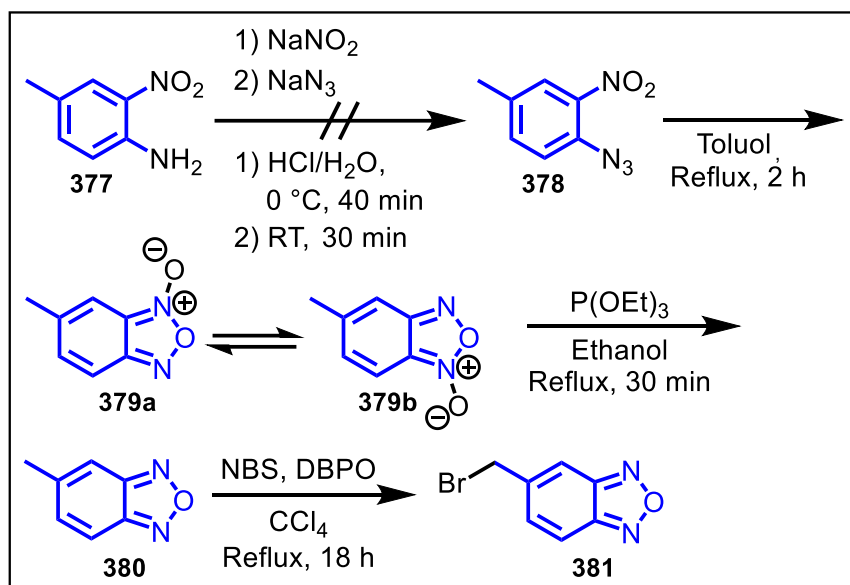


**Abbildung 162:** Elektronenwolken von Nitrobenzol, Benzonitril, Benzooxadiazol und Isobenzofuranon (modifiziert nach *cambridge medchem consulting*)<sup>[564]</sup>

Der Versuch, die Nitro-Gruppe gegen einen Oxadiazol-Ring auszutauschen, sollte nach einer Synthesesequenz von DEGHATI *et al.* erfolgen (**Schema 79**).<sup>[565]</sup> 1-Azido-4-methyl-2-nitrobenzol (**378**) sollte dabei unter Rückfluss in Toluol zunächst eine Cyclokondensation über einen Nitren-Mechanismus oder einen electrocyclischen Prozess unter Abspaltung von Stickstoff zum 6-Methyl-benzo[c]-1,2,5-oxadiazol-*N*-oxid (**379a**) erfahren.<sup>[566,567]</sup> Dieses tautomerisiert über ein *ortho*-Dinitrosobenzol zum Benzofuroxan-5-methyl-benzo[c]-1,2,5-oxadiazol-*N*-oxid (**379b**).<sup>[568,569]</sup> Der Umsatz mit Triethylphosphit in Ethanol unter Reflux sollte dann eine Deoxygenierung zum Benzofurazan-5-Methylbenzo[c]-1,2,5-oxadiazol (**380**) herbeiführen, die vermutlich wiederum über Dinitrosobenzol verläuft.<sup>[570]</sup> Letztlich sollte eine benzyliche Bromierung durch *N*-Bromsuccinimid und Benzoylperoxid zum 5-(Brommethyl)benzo[c]-1,2,5-oxadiazol (**381**) erfolgen. Jedoch scheiterte das Vorhaben bereits daran, 4-Methyl-2-nitroanilin (**377**) mittels Natriumnitrit und Salzsäure bei 0 °C zu



Diazotieren und das Diazonium-Ion mit Natriumazid nach einer Vorschrift von DESTRO *et al.* umzusetzen.<sup>[571]</sup> 5-(Brommethyl)benzo[c]-1,2,5-oxadiazol (**381**) wurde im weiteren Verlauf der Arbeit dann jedoch kommerziell erworben.

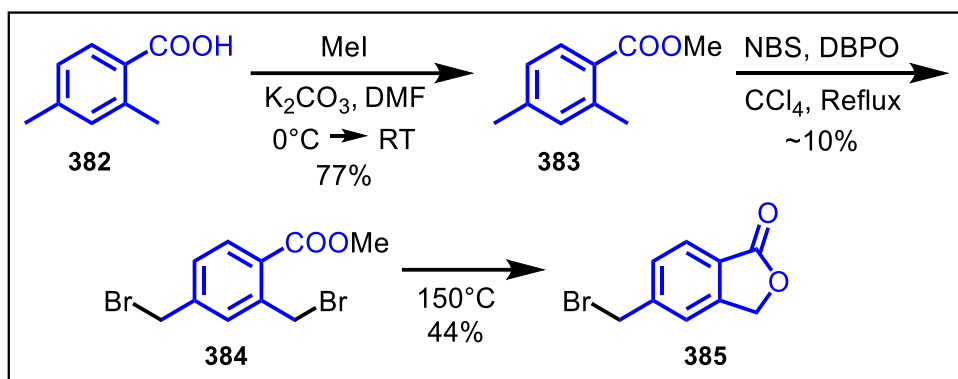


**Schema 79:** Gescheiterte Synthesesequenz zur Darstellung von 5-(Brommethyl)benzo[c]-1,2,5-oxadiazol ausgehend von 1-Azido-4-methyl-2-nitrobenzol

Zur Darstellung des Isobenzofuran-1(3*H*)-on-Derivats **Schl-33.498** wurde 2,4-Dimethylbenzoesäure (**382**) unter basischen Bedingungen zunächst gemäß einer Vorschrift von NICOLAOU *et al.* mit Methyljodid in den entsprechenden Ester **383** überführt.<sup>[572]</sup> Das 2,4-Bis-(brommethyl)methylbenzoat wurde im Weiteren dann mit zwei Äquivalenten *N*-Bromsuccinimid unter Zusatz von Dibenzoylperoxid in Tetrachlorkohlenstoff unter Bildung von Methyl-2,4-bis(brommethyl)benzoat (**384**) erhitzt, wobei sich die mangelhafte Ausbeute von etwa 10% auf die Bildung von zahlreichen Nebenprodukten wie etwa mono- aber auch tribromierten Produkten zurückführen lässt. Das 2,4-Bis(brommethyl)methylbenzoat wurde abschließend thermisch zum Brommethylphthalid **385** cyclisiert (**Schema 80**).<sup>[573]</sup>

Ein vorheriger Versuch, das  $\gamma$ -Lacton nach einer Vorschrift von HAYAT *et al.* ausgehend von 2,4-Dimethylbenzoesäure mittels Natriumbromat und Natriumhydrogensulfit in einem zwei Phasen-System aus Ethylacetat und Wasser über 40 h bei Raumtemperatur zu synthetisieren, war indessen gescheitert.<sup>[574]</sup> Hierbei sollte *in situ* hypobromige Säure entstehen, die ihrerseits wiederum ein Bromradikal liefert, das dann die Alkylbenzolkarbonsäure an der Phasengrenze, vorwiegend in  $\alpha$ -Position, zu 2-(Brommethyl)-4-methylbenzoesäure bromiert. Das Carboxylat sollte daraufhin spontan einen intramolekularen, nucleophilen Angriff auf das Benzylbromid vollziehen. 2,4-Bis(brommethyl)benzoesäure und damit verbunden auch 5-(Brommethyl)-isobenzofuran-1-(3*H*)-on sollten lediglich als Nebenprodukte anfallen.

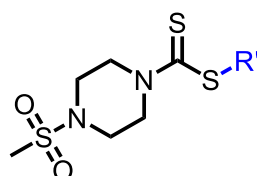




**Schema 80:** Syntheseroute zur Darstellung von 5-(Bromomethyl)isobenzofuran-1(3H)-on aus 2,4-Dimethylbenzoesäure

Die dargestellten Bromide wurden wiederum mit 1-(Methylsulfonyl)piperazin und Kohlenstoffdisulfid zu den Dithiocarbamaten umgesetzt. *In vitro* zeigten sie wie auch das Nitril-Derivat **Schl-33.165**, das bereits in der Kombinationsserie 1 entstand, allerdings keinen signifikanten antischistosomal Effekt.

**Tabelle 42:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten des Oxadiazol- und Isobenzofuran-1(3H)-on-Derivats als NO<sub>2</sub>-Bioisostere (\* Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)

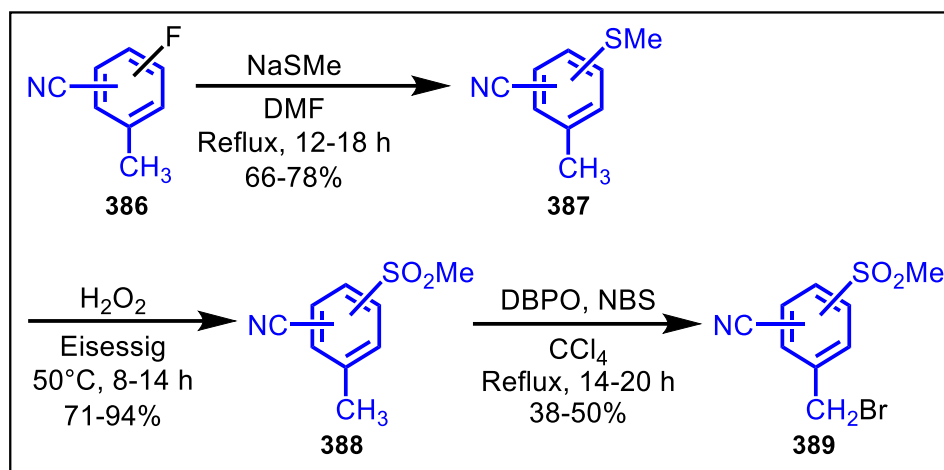


R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.498</b>	78	 <b>Schl-33.687</b>	2*

### 3.8.6 Kombination der bisher antischistosomal aktivsten Substituenten

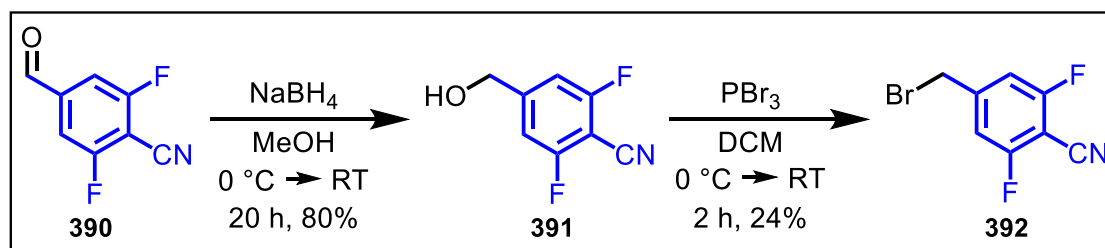
Als weitere Möglichkeit zum Austausch der Nitro-Gruppe wurde eine Kombination der beiden (neben der Nitro-Gruppe) wirksamsten Substituenten des Benzyl-Restes aus der Arbeit von P. MÄDER durchgeführt.<sup>[286]</sup> Dazu wurde der Aromat sowohl mit einer Cyano- als auch einer Sulfonylmethyl-Gruppe versehen. Als Ausgangssubstanzen der Synthese dienten fluorierte Methylbenzonitrile des Typs **386** wie 2-Fluor-4-methylbenzonitril, 3-Fluor-4-methylbenzonitril, 2-Fluor-5-methylbenzonitril und 5-Fluor-2-methylbenzonitril. Diese wurden einer nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktion mit Natriummethylmercaptid in *N,N*-Dimethylformamid unter Rückfluss unterzogen (**Schema 81**). Dabei wurde das Fluoratom jeweils durch die Methylmercapto-Gruppe ersetzt und ein Thioether (**387**) gebildet. Die

Reaktion verläuft über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Sofern die Cyano-Gruppe in Nachbarschaft zu dem durch das Nucleophil angegriffenen Fluor-substituierten Kohlenstoffatom steht, sollte die Reaktion besonders günstig sein. Dies lässt sich damit erklären, dass die intermediär gebildete Zwischenstufe, bei der eine zusätzliche negative Ladung im Aromaten auftritt, auch über die Cyanogruppe als *-M*-/*-I*-Substituent delokalisierbar ist und somit stabilisiert wird. Sofern sich die Cyano-Gruppe hingegen in *meta*-Position zum Fluor-Substituenten befindet und stattdessen die Methylgruppe als *+I*-Substituent in *ortho*-Position sitzt, sollte ein nucleophiler Angriff erschwert sein. Dies spiegelt sich auch in den Ausbeuten wider. Dennoch konnten alle Reaktionsprodukte in überaus guten Ausbeuten von 66-78% dargestellt werden. Nach Oxidation der Thioether (eine Oxidation der Methylgruppe wurde nicht beobachtet) mit dem starken Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid in Eisessig zu den Sulfonen **388**, wobei sich die Oxidationszahl des Schwefelatoms von 0 auf +IV änderte, folgte eine radikalische Bromierung in der Seitenkette zu **389**. Das Toluolderivat wurde dazu mit Azobis(isobutyronitril) als Radikalstarter und *N*-Bromsuccinimid, in dem Brom formal positiv vorliegt, unter Hitzeeinwirkung und Ausschluss von Sauerstoff umgesetzt. Dabei führte die Bromierung wiederum nur zu mittleren Ausbeuten von 38-50%. Ein Unterschied bei der Bromierung war trotz der unterschiedlichen Anordnung der Substituenten am Aromaten nicht festzustellen, obwohl das intermediär gebildete Radikal in einigen Fällen durch Mesomeriestabilisierung in besonderer Weise stabilisiert sein sollte. So ist in einigen Fällen die günstige *ortho*- und *para*-Position gleichzeitig besetzt, wodurch die Ausbildung nur einer mesomeren Grenzformel anstelle von zwei möglich ist. Eine Bromierung der Methylsulfonylgruppe blieb gänzlich aus, da die benzyllische Position aufgrund der direkten Nachbarschaft zum Ring und der damit verbundenen Stabilisierung etwaiger Radikale bevorzugt ist. Ein Problem war jedoch eine gewisse Selektivität der Bromierung. Neben der Bildung von Monobromiden wurden auch Dibromide beobachtet. Beide Produkte waren voneinander nur schwer abtrennbar. Die Reaktion ließ sich auch durch die Änderung der Reaktionszeit oder der eingesetzten Äquivalente an *N*-Bromsuccinimid nicht zugunsten der Monobromide beeinflussen.



**Schema 81:** Reaktionssequenz zur Darstellung der Kombinationsprodukte mit -CN- und -SO<sub>2</sub>Me-Gruppe am Benzylrest

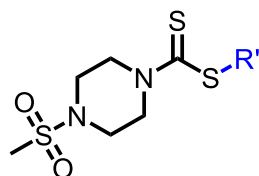
Des Weiteren wurde die *para*-ständige Cyano-Gruppe mit zwei direkt benachbarten Fluorsubstituenten kombiniert, hatte sich das Derivat **Schl-33.510** mit einer 3,4,5-Trifluorbenzyl-Gruppe doch als aktiv gegenüber den Schistosomen erwiesen. Der Austausch des Fluorsubstituenten in *para*-Position gegen eine stärker elektronenziehende Cyano-Gruppe, die im Vergleich mit einer Trifluormethyl- oder Methylsulfonyl-Gruppe verhältnismäßig klein ist, war somit naheliegend, um einen möglichen Zugewinn an Aktivität zu erzielen. Die Synthese des 4-(Bromomethyl)-2,6-difluorbenzonitrils erfolgte analog zu der des 3,4,5-Trichlorbenzylbromids (**Schema 82**).



**Schema 82:** Synthesesequenz zur Darstellung von 4-(Bromomethyl)-2,6-difluorbenzonitril aus dem entsprechenden Benzaldehyd

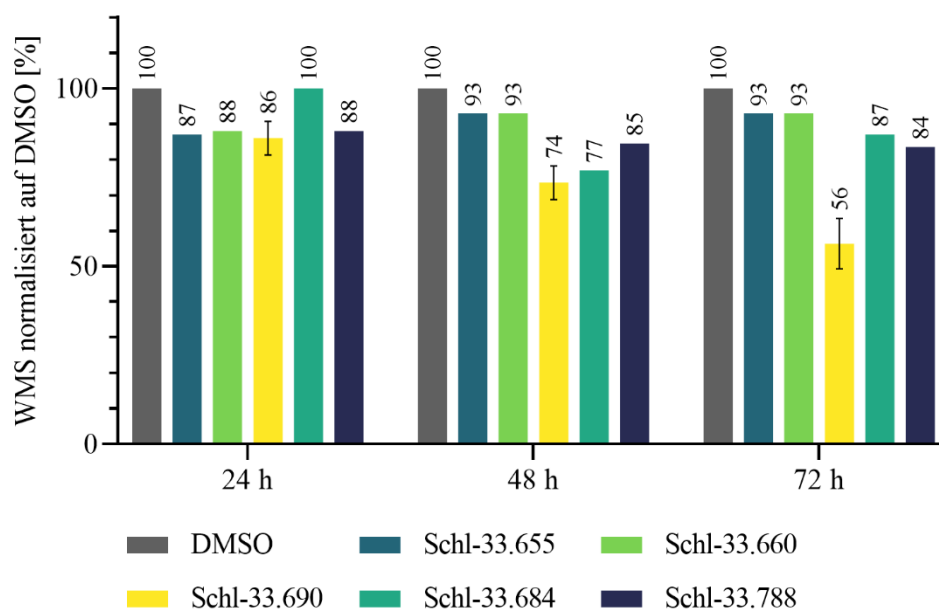
Die Benzylbromide mit den kombinierten Substituenten wurden letztlich zu den Dithiocarbamat-Derivaten umgesetzt. Die Reaktionsprodukte und Ausbeuten sind in **Tabelle 43** gezeigt.

**Tabelle 43:** Strukturformeln und Gesamtausbeuten der Derivate der Kombination von CN- und SO<sub>2</sub>Me-Gruppe am Benzyl-Rest (Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)

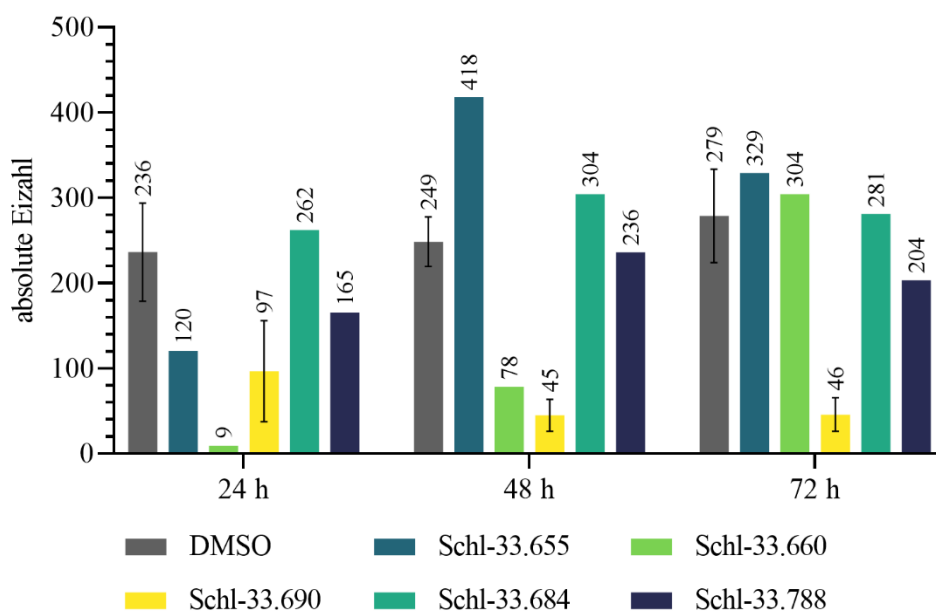


R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 Schl-33.655	21	 Schl-33.690	18
 Schl-33.660	15	 Schl-33.684	25
		 Schl-33.788	15

Wie aus den **Abbildungen 163** und **164** hervorgeht, zeigte von den Derivaten der Kombination von CN- und SO<sub>2</sub>Me-Gruppe sowie der Kombination von F- und CN-Gruppe am Benzyl-Rest nur Verbindung **Schl-33.690** mit Methylsulfonyl-Gruppe in *meta*-Position und Cyano-Gruppe in *para*-Position zur Methylengruppe eine signifikante antischistosomale Aktivität. Nach 72 h bei einer Konzentration von 10 µM war ein eindeutiger Effekt bezüglich der Motilität zu beobachten; diese ging um etwa 44% zurück. Zudem wurden auch das Paarungsverhalten und die Eiproduktion über 72 h beeinflusst. Letztgenannte nahm um etwa 80% gegenüber der DMSO-Referenz ab und war bereits nach 48 h deutlich reduziert. Vereinzelt waren nach 72 h männliche und weibliche Würmer mit schwachen Darmdilataationen aufzufinden. Die Motilität nach 72 h blieb bis zu einer Konzentration von 3 µM um etwa 20% reduziert und auch die absoluten Eizahlen nach 72 h lagen bis zu einer Konzentration von 4 µM noch deutlich unter 100 Eiern. Die Anzahl entpaarter Würmer war ab 4 µM nicht mehr auffällig. **Schl-33.690** wirkte bis 100 µM nicht zytotoxisch auf HepG2-Zellen.



**Abbildung 163:** WMS der Derivate der Kombination von CN- und SO<sub>2</sub>Me-Gruppe sowie der Kombination von F- mit CN-Gruppe am Benzyl-Rest nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu$ M



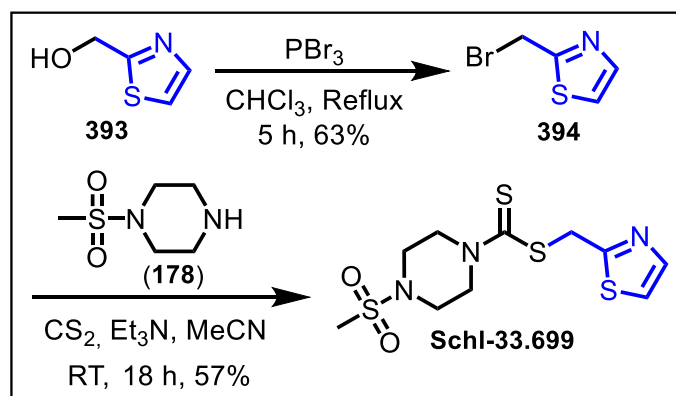
**Abbildung 164:** Absolute Eizahlen der Derivate der Kombination von CN- und SO<sub>2</sub>Me-Gruppe sowie der Kombination von F- mit CN-Gruppe am Benzyl-Rest nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu$ M

### 3.8.7 $\pi$ -Elektronenarme Fünfring-Heteroaromaten

Der Nitrobenzyl-Rest wurde schließlich auch durch andere „elektronenarme“ 5-Ring-Heteroaromaten ausgetauscht. Monozyklische Fünfring-Heteroaromaten bei denen das nichtbindende freie Elektronenpaar des Heteroatoms Teil des  $\pi$ -Elektronensextetts ist, wodurch sich die  $\pi$ -Elektronendichte an den Ring-Kohlenstoffatomen auf Kosten des Heteroatoms erhöht, sind im Allgemeinen  $\pi$ -elektronenreich. Die  $\pi$ -Elektronen sind hier gegenüber einem 6-Ring-Aromaten, bei dem die 6  $\pi$ -Elektronen gleichmäßig über den Ring delokalisiert sind und die Elektronendichte an jedem C-Atom identisch ist, auf ein kleineres System verteilt.

Während ein Schwefel-Atom sein Elektronenpaar bereitwillig für die Delokalisierung zur Verfügung stellt, ist ein Sauerstoff-Atom aufgrund seiner hohen Elektronegativität nur in vermindertem Maße dazu bereit, weshalb Thiophen „aromatischer“ als Furan ist. Fünfgliedrige Heterozyklen mit zwei oder mehr Heteroatomen werden nun wiederum elektronenärmer, da die freien Elektronenpaare der weiteren Heteroatome senkrecht zum  $\pi$ -System stehen und deshalb nicht an der Mesomerie beteiligt sind. Dies erklärt auch die Basizität von Imidazol gegenüber Pyrrol. Aufgrund ihrer Elektronegativität ziehen die weiteren Heteroatome die Elektronen, die sich zuvor über den Ring verteilen, in ihre Richtung, was eine ungleichmäßige Elektronendichteverteilung im Ring und damit eine deutliche  $\pi$ -Elektronenverarmung zur Folge hat. Thiazol ist aus diesem Grund elektronenärmer als Thiophen. Oxazol wiederum ist elektronenärmer als Furan. Oxazol ist dabei von den genannten Heterozyklen am elektronenärmsten. Auch in der Reihe der ausschließlich stickstoffhaltigen-Heterozyklen nimmt die Elektrondichte mit jedem weiteren Stickstoff-Atom im Ring ab, angefangen beim Pyrrol über das Imidazol und Triazol bis hin zum Tetrazol. Da eine Nitro-Gruppe mit ihrem Elektronenzug einen Aromaten elektronenarm macht, schien an dieser Stelle der Ersatz des Nitrobenzyl-Restes durch ein Oxazol-, Thiazol-, Triazol- und Tetrazol-Ringsystem sinnvoll.

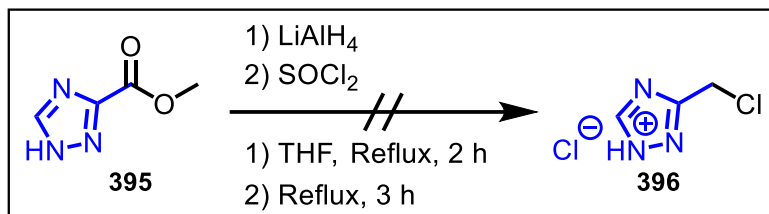
Die Synthese der Heteroaromaten erfolgte über die bekannte *one-pot*-Reaktion mit Kohlenstoffdisulfid und den entsprechenden kommerziell erhältlichen Halogeniden. Im Falle des Oxazol-Derivats **Schl-33.702** war dies das 2-(Chlormethyl)oxazol, wohingegen im Falle des Tetrazol-Derivats **Schl-33.696** 5-(Brommethyl)-1*H*-tetrazol Verwendung fand. Für das Thiazol-Derivat **Schl-33.699** wurde das 2-(Brommethyl)thiazol (**394**) aus Thiazol-2-yl-methanol (**393**) mittels Phosphortribromid in Chloroform unter Rückfluss nach einer Vorschrift von RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.* dargestellt (**Schema 83**).<sup>[575]</sup>



**Schema 83:** Synthesesequenz des Thiazol-Derivats **Schl-33.699** als Nitrobenzyl-Ersatz

Ein Unterschied hinsichtlich der Reaktivität der Halogenide aufgrund der besseren Abgangsgruppe  $\text{Br}^-$  gegenüber  $\text{Cl}^-$  während der *one-pot*-Reaktion konnte nicht festgestellt werden. Alle Reaktionsprodukte wurden in guten Ausbeuten erhalten (**Tabelle 44**).

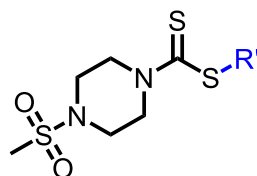
Die Darstellung des 1,2,4-Triazol-Derivats aus 1,2,4-Triazol-3-methylcarboxylat (**395**) durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid und darauffolgender Chlorierung des (1,2,4-triazol-3-yl)methanols mit Thionylchlorid nach einer Vorschrift von JONES *et al.* scheiterte womöglich an den harschen Reaktionsbedingungen (**Schema 84**).<sup>[576]</sup>

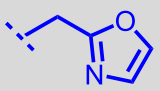
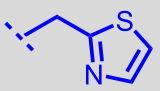
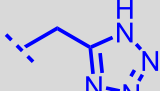


**Schema 84:** Fehlgeschlagener Syntheserversuch eines 1,2,4-Triazol-Derivats als Nitrobenzyl-Ersatz

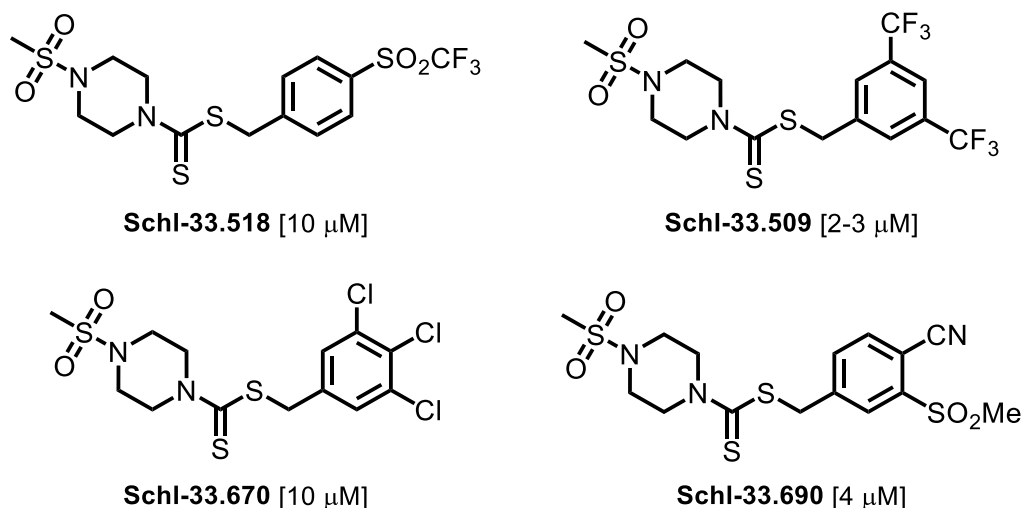
Lediglich das Oxazol-Derivat **Schl-33.702** hatte von den „elektronenarmen“ 5-Ring-Heteroaromaten in der *in-vitro*-Testung bei einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  einen schwachen Effekt auf die Paarungsstabilität. Die Unwirksamkeit des Tetrazol-Derivats **Schl-33.696**, welches einen  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert von 4,89 besitzt, könnte womöglich auf den Umstand zurückzuführen sein, dass dieses bei physiologischem pH-Wert überwiegend deprotoniert vorliegt. Die negative Ladung verschlechtert aber nicht nur die Membrangängigkeit, sondern verringert auch den Elektronenzug, den die Heteroatome auf den 5-Ring ausüben, sodass die erwartete  $\pi$ -Elektronenverarmung deutlich vermindert wird.

**Tabelle 44:** Strukturformeln und Ausbeuten der elektronenarmen Heteroaromaten (\* Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



$\text{R}' =$	Ausbeute [%]	$\text{R}' =$	Ausbeute [%]	$\text{R}' =$	Ausbeute [%]
	36		62*		62
<b>Schl-33.702</b>		<b>Schl-33.699</b>		<b>Schl-33.696</b>	

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ersatz der Nitro-Gruppe mit einem deutlichen Verlust der Aktivität einherging. Sofern eines der Derivate ohne Nitro-Gruppe aktiv war, führte es (wenn überhaupt) zumeist zu deutlich schwächeren Phänotypen. Ein adäquater Ersatz des *para*-Nitrobenzyl-Restes ist, wenngleich es einzelne Ausnahmen von antischisosomal aktiven Dithiocarbamat-Derivaten innerhalb dieser Arbeit wie in der Kombinationsserie 1 und 2 gibt, eher schwierig. Einen signifikanten Effekt auf die Motilität bei 10  $\mu\text{M}$  hatten sowohl das trisubstituierte Fluor-Derivat **Schl-33.518** als auch das entsprechende Chlor-Derivat **Schl-33.670**. Gleiches gilt für das (Trifluormethyl)sulfonyl-Derivat **Schl-33.518**. Großen Einfluss auf die Eiproduktion und Paarungsstabilität auch noch unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  hatte insbesondere das 3,5-Bis-(trifluormethyl)benzyl-Derivat **Schl-33.509**. Weniger stark auf diese Parameter wirkte das Produkt **Schl-33.690** der Kombination von Cyano- mit Sulfonylmethyl-Gruppe. All diese gegenüber den adulten Schistosomen der Art *S. mansoni* wirksamen Derivate ohne Nitro-Gruppe in *para*-Position des Benzyl-Restes waren zudem bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch (**Abb. 165**).



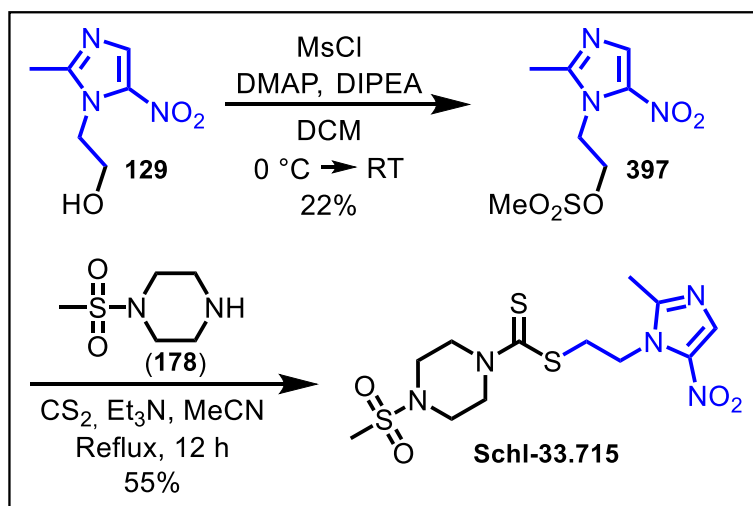
**Abbildung 165:** Strukturformeln der wirksamsten und bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxischen Derivate ohne Nitro-Gruppe am Benzyl-Rest und deren jeweils niedrig wirksamste Konzentration

### 3.8.8 Ersatz des Nitrobenzyl-Restes durch andere Nitroaromaten

Um zu überprüfen, ob die metabolische Labilität der Nitro-Gruppe für die antischistosomale Aktivität verantwortlich ist, sollte der *para*-Nitro-Benzyl-Rest in letzter Konsequenz durch andere Nitro-Aromaten wie etwa ein Nitro-Imidazol ausgetauscht werden. Wären die Biotransformationsprodukte der Nitro-Gruppe für die Wirkung verantwortlich, dürfte ein Austausch des Nitrobenzyl-Restes gegen einen anderen Nitro-Aromaten keinen wesentlichen Aktivitätsverlust verursachen. Von den Nitro-Imidazolen wurde das Metronidazol (**129**) ausgewählt, um ein Metronidazol-Dithiocarbamat-Konjugat darzustellen, da eine Verknüpfung über die freie Hydroxy-Gruppe aus chemischer Sicht unproblematisch erschien. Die schlechte



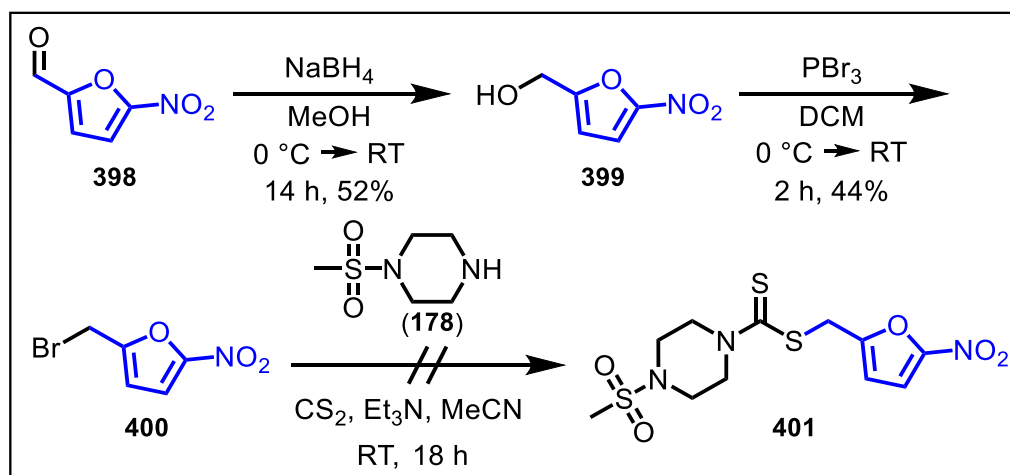
Abgangsgruppenqualität der OH-Gruppe wurde durch Mesylierung und Bildung des Methansulfonsäureesters **397** mit 4-(Dimethylamino)pyridin und Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur nach einer Vorschrift von ASPATWA *et al.* wesentlich verbessert (**Schema 85**).<sup>[577]</sup> Dabei stellte die überaus geringe Löslichkeit des Metronidazols in organischen Lösungsmitteln wie auch Dichlormethan ein Problem bei der Aktivierung dar. Sie ist wahrscheinlich der Grund für die recht niedrige Ausbeute von nur 22%. Eine vorherige Chlorierung mit Thionylchlorid in siedendem Chloroform nach einer Vorschrift von KUMAR *et al.* sowie eine Bromierung mit  $\text{PCl}_3/\text{Br}_2$  in Ethylacetat und darauffolgende wässrige Aufarbeitung nach einer Vorschrift von DU *et al.* scheiterten darüber hinaus womöglich an der Hydrolyselabilität der Halogenide.<sup>[578,579]</sup> Im Verhältnis zu den Halogeniden konnte damit aber die beste Abgangsgruppe erfolgreich eingeführt werden. So stellt das Mesylation, das durch Mesomerie in besonderer Weise stabilisiert wird, eine schwache Base dar, die durch eine hohe Basenkonstante ( $\text{pK}_\text{s} = -1,9$ ) gekennzeichnet ist. Der Methansulfonsäureester **397** wurde in einer *one-pot*-Reaktion abschließend zum Dithiocarbamat umgesetzt. Dabei wurde das zunächst gebildete Dithiocarbamat-Anion gemeinsam mit dem Mesylat in einem Druckröhrchen erhitzt. Das Dithiocarbamatkonjugat **Schl-33.715** fiel in einer mittleren Ausbeute von 55% an.



**Schema 85:** Konjugatbildung von Metronidazol mit einem Dithiocarbamat

Ein Austausch des *para*-Nitrobenzyl-Restes gegen Nitrofuran wurde ebenfalls versucht. Nach SOLTANI-GHOFRANI *et al.* wurde 5-Nitrofuran-2-carbaldehyd (**398**) dazu mit Natriumborhydrid in (5-Nitrofuran-2-yl)methanol (**399**) überführt und anschließend mit Phosphortribromid zu 2-(Brommethyl)-5-nitrofuran (**400**) umgesetzt (**Schema 86**).<sup>[580]</sup> Jedoch konnte das Nitrofuran-Derivat **401** trotz zahlreicher Syntheseveruche und Optimierungsschritte nicht erfolgreich dargestellt werden, was vermutlich auf eine erhöhte Photolabilität des Nitrofurans

zurückzuführen ist. Für zukünftige Arbeiten wäre der Versuch der Darstellung eines 5-Nitrothiophen- oder 5-Nitrothiazol-Derivats eine Alternative.



**Schema 86:** Fehlgeschlagener Syntheseversuch des Nitrofuran-Derivats **387**

Das Metronidazol-Konjugat **Schl-33.715** erwies sich gegenüber den Schistosomen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  als inaktiv. Dies lässt vermuten, dass die antischistosomale Aktivität der Dithiocarbamate möglicherweise nicht von der Reduktion der Nitro-Gruppe abhängt.

### 3.8.9 Variation der Substituenten im 4-Nitro-*ortho*-Kresol-System

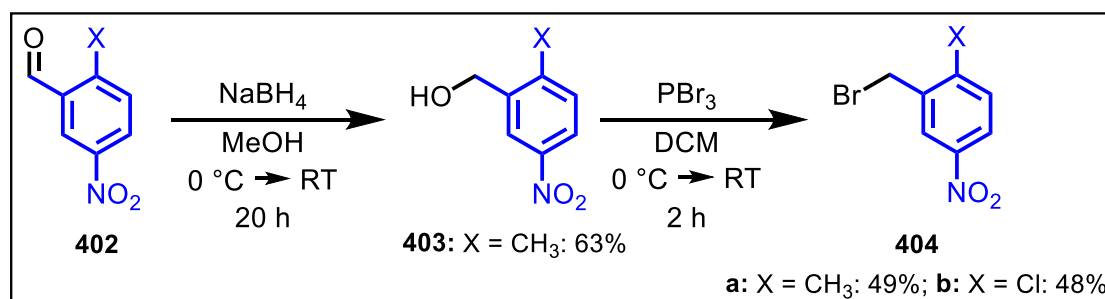
Neben dem Ersatz der Nitrogruppe in *para*-Position des Benzylsubstituenten wurde ein Ersatz der Nitrogruppe auch im 4-Nitro-*ortho*-Kresol-System angestrebt. Der 2-Hydroxy-nitrobenzyl-Rest zählte in der Arbeit von P. MÄDER gleichwohl zu einem der besten auf Seiten des einfach gebundenen Schwefelatoms der Dithiocarbamat-Gruppe.<sup>[286]</sup>

#### Ersatz der Hydroxy-Gruppe in 2-Position des Benzylsubstituenten mit 5-Nitro-Gruppe

Um die Synthese des mit zwei unterschiedlichen Substituenten versehenen Benzyl-Gerüsts zu erleichtern, und die Möglichkeit des Austausches der  $\text{NO}_2$ -Gruppe damit zu erhöhen, wurde zunächst über die Notwendigkeit der OH-Gruppe in 2-Position des Benzylsubstituenten nachgedacht. So stellt der Ersatz eines definierten Substituenten an einem aromatischen System mit mehreren Substituenten, die genau definierte Positionen an ebendiesem einnehmen, eine besondere synthetische Herausforderung dar. Ein Austausch der phenolischen OH-Gruppe gegen einen anderen Substituenten schien auch insofern sinnvoll, als diese innerhalb einer etwaigen Synthesesequenz möglicherweise einer Schutzgruppe bedarf, womit weitere Reaktionsschritte verbunden wären. Außerdem sind Phenole schwach acide, was ihre Reinigung erschwert. Weiterhin ist eine Reaktion als Nucleophil und damit mit einem möglicherweise eingesetzten Halogenierungsmittel im Zuge einer Synthese prinzipiell denkbar. Die OH-Gruppe gegen eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe auszutauschen, die Erstgenannter sowohl hinsichtlich

der elektronischen Eigenschaften als auch in ihrer Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden am ähnlichsten ist, wurde nicht verfolgt, da sie insbesondere infolge der synthetischen Komplexität keinen Vorteil gebracht hätte. Die OH-Gruppe mit ihrem *-I*- sowie *+M*-Effekt, wobei letzterer überwiegt, weshalb die OH-Gruppe letztlich elektronenschiebend wirkt, wurde aus diesem Grund als erstes durch eine gleichwohl elektronenschiebende Methylgruppe mit einem *+I*-Effekt ersetzt. Daneben erfolgte durch das Einführen eines Cl- und F-Substituenten die Umkehr des Elektronenschubs hin zu einem Elektronenzug, wobei dieser vom Cl- hin zum F-Substituenten abgeschwächt in Erscheinung tritt.

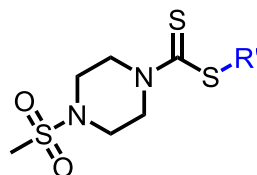
Die Synthese der substituierten Benzylbromide **404** wurde nach der bereits beschriebenen Route vorgenommen und ging im Falle des Methylsubstituenten von dem entsprechenden Benzaldehyd **402** aus. Für das 2-Chlor-5-nitrobenzyl-Derivat, das als Benzylalkohol **403** erhältlich war, setzte die Synthese eine Stufe später ein (**Schema 87**). Das Fluor-Derivat war als Benzylbromid kommerziell zu erwerben.



**Schema 87:** Synthesesequenz zur Darstellung von 5-Nitrobenzylbromiden mit variablem Substituenten in 2-Position

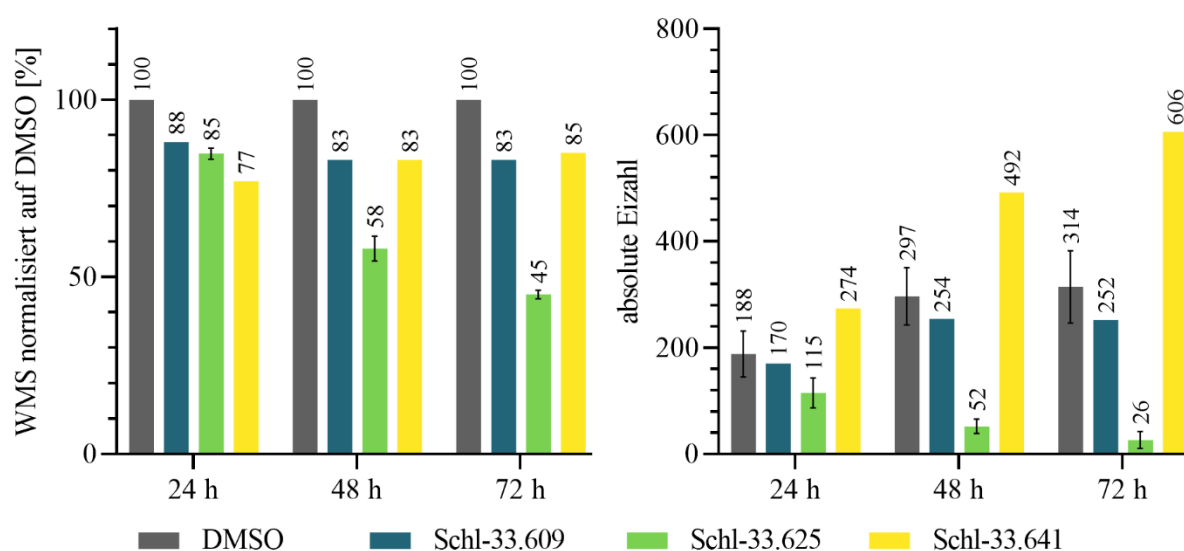
Alle dargestellten, in der 2-Position substituierten 5-Nitrobenzylbromide konnten in die entsprechenden Dithiocarbamat-Derivate überführt werden (**Tab. 45**).

**Tabelle 45:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten der 5-Nitrobenzyl-Derivate mit variablen Substituenten in 2-Position (\* Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)



R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
	27*		88		36*
Schl-33.641		Schl-33.609		Schl-33.625	

Von den Dithiocarbamat-Derivaten mit variablen Substituenten in 2-Position des 5-Nitrobenzyl-Restes war nur das Chlor-Derivat **Schl-33.625** aktiv. Es zeigte nach 48 h eine um etwa 40% reduzierte Motilität und annähernd vollständige Entpaarung (**Abb. 166**). Zusätzlich ging die Eiproduktion nach 48 h um etwa 80% gegenüber der DMSO-Kontrolle zurück. 72 h nach Beginn der Testung lag die Motilität bei nur noch 45% der Norm und die Eiproduktion unter 10%. Zudem wurden starke Tegumentschäden nach 48 h festgestellt. Bei Weibchen waren nach 48 h außerdem vereinzelt Darmdilataationen festzustellen. Ab 5  $\mu\text{M}$  verschwanden diese Effekte. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Hydroxy-Gruppe nicht unersetzbar ist und ihre Anwesenheit im Molekül nicht zwingend notwendig ist. Auch ihre elektronenschiebende Eigenschaft und die Fähigkeit H-Brücken auszubilden, ist nicht zwangsläufig für eine Wirksamkeit erforderlich. Vielmehr kann sie durch einen in seinen Eigenschaften gegenläufigen Substituenten ohne jeglichen Wirkungsverlust ausgetauscht werden. In diesem Fall führte der Austausch gar erst zu einer antischistosomalen Aktivität, da das entsprechende Dithiocarbamat-Derivat **Schl-33.004** der Kombinationsserie 1 mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  selbst wirkungslos blieb.



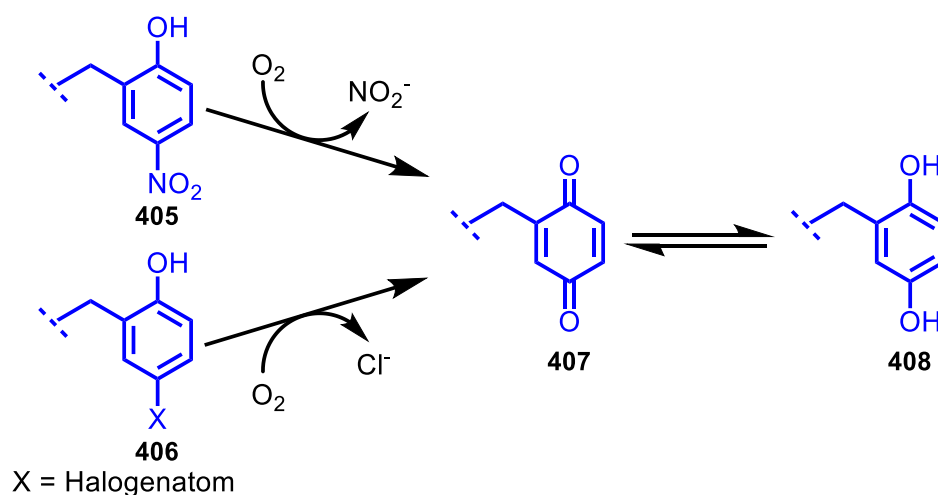
**Abbildung 166:** WMS und absolute Eizahlen der 5-Nitrobenzyl-Derivate mit variablen Substituenten in 2-Position nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu\text{M}$

### Ersatz der Nitro-Gruppe in 5-Position des Benzylsubstituenten mit 2-Hydroxy-Gruppe

Im nächsten Schritt wurde die 5-Nitro-Gruppe am 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest in Analogie zu der Monosubstitution am *para*-Nitrobenzyl durch die elektronenziehenden Gruppen -F, -CF<sub>3</sub>, -Cl, -SO<sub>2</sub>Me und -CN ersetzt (**Tabelle 46**).

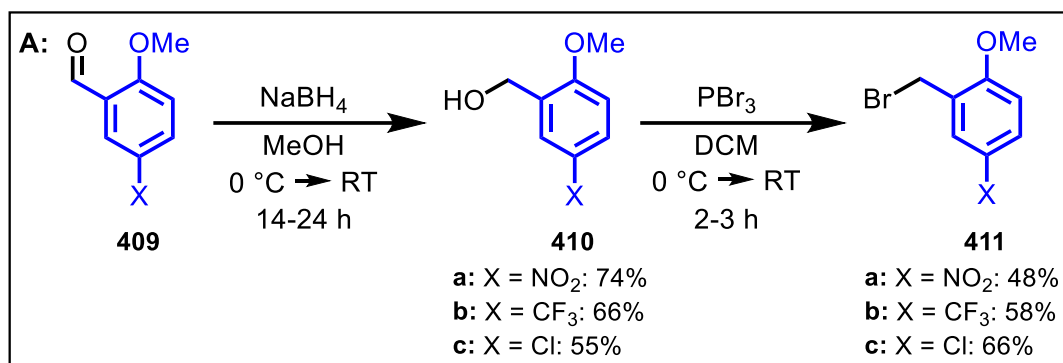
Außer ähnlichen elektronischen Effekten (wobei sich die Substituenten hinsichtlich der Intensität des Elektronenzuges durchaus unterscheiden), die einen Austausch der Nitro-Gruppe insbesondere gegen ein Chlor- aber auch ein Fluor-Derivat plausibel erscheinen lassen, ist die

Tatsache potenziell ähnlicher Biotransformationsprodukte zu nennen. So könnten Nitro-Phenole wie **405** durch eine Monooxygenase zunächst hydroxyliert und dann denitriert werden; es entstünden Benzochinone (**407**). Diese stehen im Gleichgewicht mit den entsprechenden Hydrochinonen (**408**), die durch eine Reduktase gebildet werden. Auch mit einem Halogenatom-substituierte Phenole wie **406** wären nach Dehalogenierung zur Bildung von Chinonen befähigt (**Schema 88**). Benzochinone wiederum sind in der Lage, 1,4-Additionsprodukte mit Amino- oder Thiol-Gruppen von Enzymen zu bilden, wodurch eine antischistosome Wirkung möglicherweise erst zustande kommt. Eine etwaige Reaktionsfolge ist derzeit nur von Bakterien bekannt aber prinzipiell auch auf den antischistosomal Stoffwechsel übertragbar.<sup>[581]</sup>



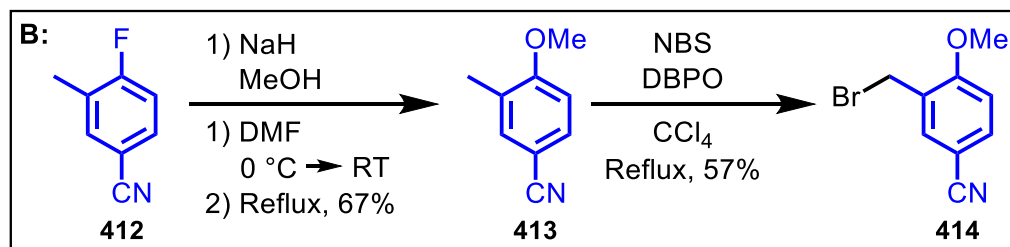
**Schema 88:** Oxidative Denitrierung beziehungsweise Dehalogenierung zum Chinon und Hydrochinon

Um die 2-Hydroxybenzyl-Derivate mit variablen Substituenten in 5-Position zu erhalten, wurden entsprechend substituierte Methyl-Phenolether für die Synthese ausgewählt. Diese besaßen wie im Falle des Chlor- (**Schl-33.706**) und Trifluormethylderivats **Schl-33.664** eine Aldehydfunktion (**409**) in der 1-Position und konnten über den Benzylalkohol **410** wie auch schon bei den vorherigen Derivaten in die Bromide **411** umgewandelt werden. Auch der Phenolether **Schl-33.705** mit Nitro-Gruppe in 5-Position wurde als Vergleichssubstanz hergestellt (**Schema 89**).



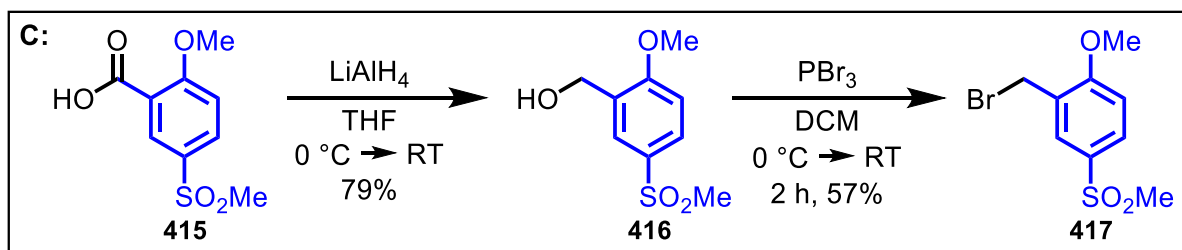
**Schema 89:** Synthesesequenz zur Darstellung von 2-Methoxybenzylbromiden mit variablem Substituenten in 5-Position

Das Benzylbromid **414** für die Darstellung des Cyano-Derivats **Schl-33.697** wurde über eine radikalische Bromierungsreaktion aus einem Toluolderivat **413** aufgebaut. Dessen Methoxy-Gruppe wurde zuvor über eine nucleophile Substitution am fluorierten Aromaten (**412**) mit Natriummethanolat erhalten, angelehnt an die Syntheseroute der Kombinationsderivate von -CN und -SO<sub>2</sub>Me zum Ersatz der Nitro-Gruppe in *para*-Position (**Schema 90**).



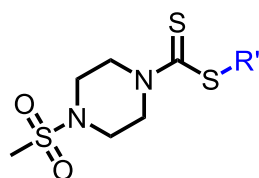
**Schema 90:** Synthesesequenz zur Darstellung des 2-Methoxybenzylbromids mit Cyano-Substituent in 5-Position

Das Benzylbromid **417** des Sulfonylmethyl-Derivats **Schl-33.576** war über die entsprechende Benzoesäure **415** zugänglich, die nach Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid den Benzylalkohol **416** ergab, der anschließend bromiert wurde (**Schema 91**).



**Schema 91:** Synthesesequenz zur Darstellung des 2-Methoxybenzylbromids mit Sulfonylmethyl-Substituent in 5-Position

Für das Fluor-Derivat **Schl-33.656** konnte das entsprechende Benzylbromid kommerziell erhalten werden. Alle dargestellten Bromide konnten wiederum in die Dithiocarbamat-Derivate überführt werden (**Tab. 46**).

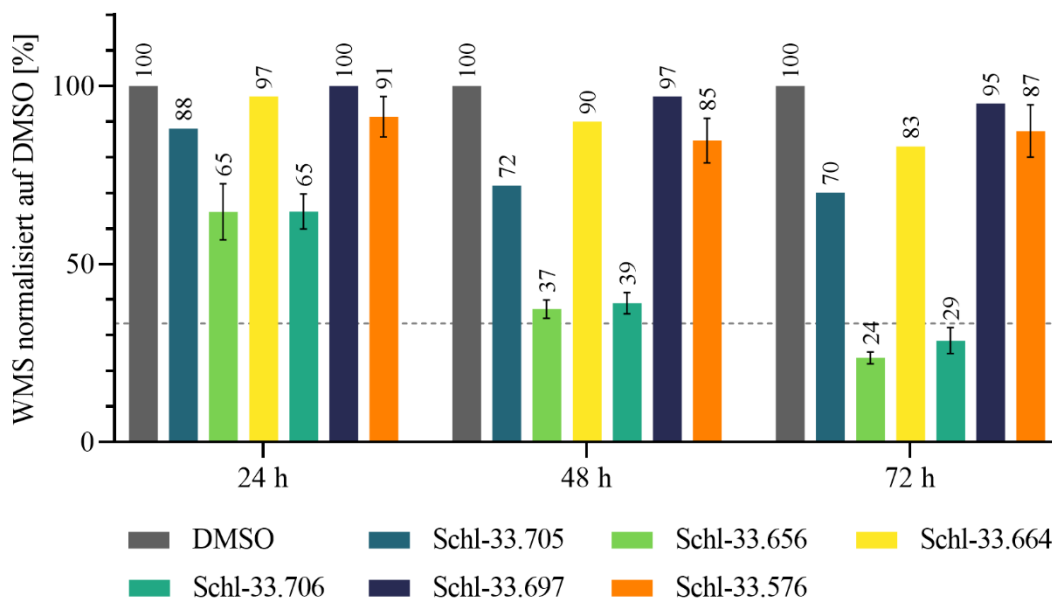
**Tabelle 46:** Strukturformeln und (Gesamt)ausbeuten der 2-Methoxybenzyl-Derivate mit variablen Substituenten in 5-Position (\* Ausbeute über mehrere Stufen berechnet)


R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
	10*		55		29*
<b>Schl-33.705</b>		<b>Schl-33.656</b>		<b>Schl-33.706</b>	
	38*		23*		26*
<b>Schl-33.664</b>		<b>Schl-33.697</b>		<b>Schl-33.576</b>	

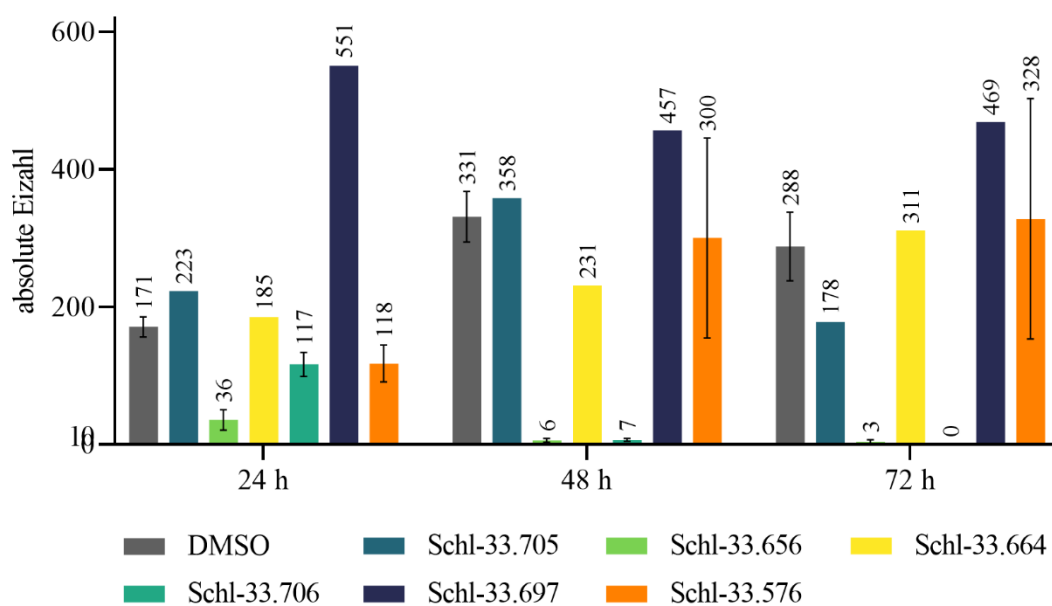
Das sich die Spaltung der Methyl-Phenolether im Weiteren als problematisch erwies (siehe unten), wurden auch diese ursprünglich als Zwischenprodukte gedachten Verbindungen einer *in-vitro*-Testung unterzogen. Schließlich ist die Bildung entsprechender Phenole im zellulären System durch oxidative Desalkylierung denkbar.

*In vitro* waren weder das Trifluormethyl- (**Schl-33.664**) noch das Sulfonylmethyl- (**Schl-33.576**) oder Cyano-Derivat (**Schl-33.710**) aktiv, wobei die beiden Erstgenannten nach spätestens 72 h noch einen deutlichen Effekt hinsichtlich der Paarungsstabilität zeigten. Selbst der Phenolether **Schl-33.705** mit Nitrogruppe zeigte nur eine schwache Wirkung. Er verursachte eine 30%-ige Reduktion der Motilität und eine deutliche Reduktion der Paarungsstabilität (**Abb. 167**). Die halogenierten Phenolether waren hingegen deutlich wirksam. Das Chlor-Derivat **Schl-33.706** führte bereits innerhalb der ersten 24 h zu einer annähernd vollständigen Entpaarung der Schistosomen. Dem Fluor-substituierten Phenolether **Schl-33.656** gelang dieses erst nach weiteren 24 h, wobei auch dieser innerhalb der ersten 24 h eine 60%-ige Entpaarung hervorrief. Bezogen auf die Produktion von Eiern wiederum wirkte **Schl-33.656** etwas früher (**Abb. 168**). Beide Derivate führten jedoch nach spätestens 48 h dazu, dass die Eiproduktion zum Erliegen kam. Die Motilität beeinflussten sowohl das Chlor- als auch das Fluor-Derivat in gleicher Weise. Nach 24 h war die Beweglichkeit der Schistosomen um bis zu 35%, nach 48 h dann um bis zu 60% eingeschränkt. Nach 72 h traten dann auch letale

Effekte auf. Davon war das Fluor-Derivat etwas deutlicher betroffen. Hinsichtlich der Phänotypen lässt sich sagen, dass das Chlor-Derivat zu sehr starken Tegumentschäden in Form von nadelförmigen Anhaftungen und Darmdilatationen führte (**Abb. 169**). Beim Fluor-Derivat waren diese ebenfalls zu beobachten. Jedoch waren diese etwas schwächer, aber immer noch stark ausgeprägt. Ab 5  $\mu\text{M}$  hatten beide Derivate nur noch einen sehr schwachen Effekt auf die Paarungsstabilität. Für das Chlor-Derivat konnten zusätzlich auch schwache Darmdilatationen an den Weibchen wahrgenommen werden.



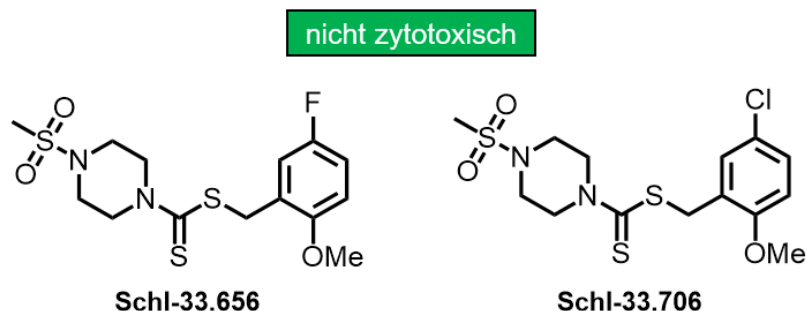
**Abbildung 167:** WMS der 2-Methoxybenzyl-Derivate mit variablen Substituenten in 5-Position nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu\text{M}$



**Abbildung 168:** Absolute Eizahlen der 2-Methoxybenzyl-Derivate mit variablen Substituenten in 5-Position nach 24, 48 und 72 Stunden bei 10  $\mu\text{M}$

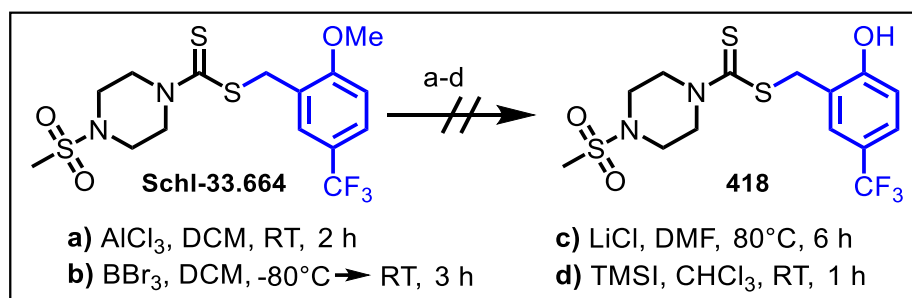


Sowohl das fluorierte Derivat **Schl-33.656** als auch das chlorierte Derivat **Schl-33.706** waren bis 100  $\mu\text{M}$  hinsichtlich der Reduktion der Zellviabilität der HepG2-Zelllinie unauffällig (**Abb. 168**).



**Abbildung 168:** Zytotoxizität der Verbindungen **Schl-33.656/706** bei 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie

Für die abschließende Spaltung der Methylether wurde das 2-Methoxy-5-trifluorbenzyl-Derivat **Schl-33.664** als Testsystem ausgewählt. An diesem wurden nun verschiedene Lewisäuren in der Reihenfolge absteigender Härte getestet (**Schema 92**). Harte Säuren sind nach dem HSAB-Konzept von PEARSON solche, die eine hohe Ladungsdichte besitzen, schlecht polarisierbar sind und eine geringe Elektronegativität haben. Zunächst wurde der Phenolether bei Raumtemperatur mit Aluminiumtrichlorid umgesetzt, woraufhin es zur Zersetzung des Dithiocarbamats kam. Auch der Einsatz von Bortribromid bei tiefen Temperaturen brachte diesbezüglich keine Änderung. Anders sah das Reaktionsgeschehen mit Lithiumchlorid bei 80 °C oder Trimethylsilyliodid bei Raumtemperatur aus. Beide führten zu keinem Umsatz. Andere Versuche, den Phenolether unter Verwendung von Bromwasserstoff oder Pyridin-Hydrochlorid zu spalten, wurden aufgrund der damit verbundenen harschen Reaktionsbedingungen nicht erprobt. Dasselbe gilt für die Verwendung von Natriumethanthiolat als ebenso gängige Methode der Spaltung eines Ethers, da dies vermutlich nucleophil an die Dithiocarbamatfunktion addiert hätte.

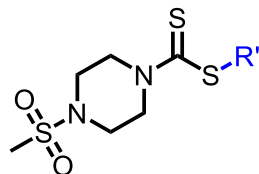


**Schema 92:** Lewis-Säure-vermittelte Reaktionsansätze zur Phenoletherspaltung

Mit Ausnahme des 2-Methoxy-5-cyanbenzyl- (**Schl-33.697**) und des 2-Methoxy-5-methylsulfonylbenzyl-Derivats **Schl-33.576**, die sich mit Bortribromid entschützen ließen,

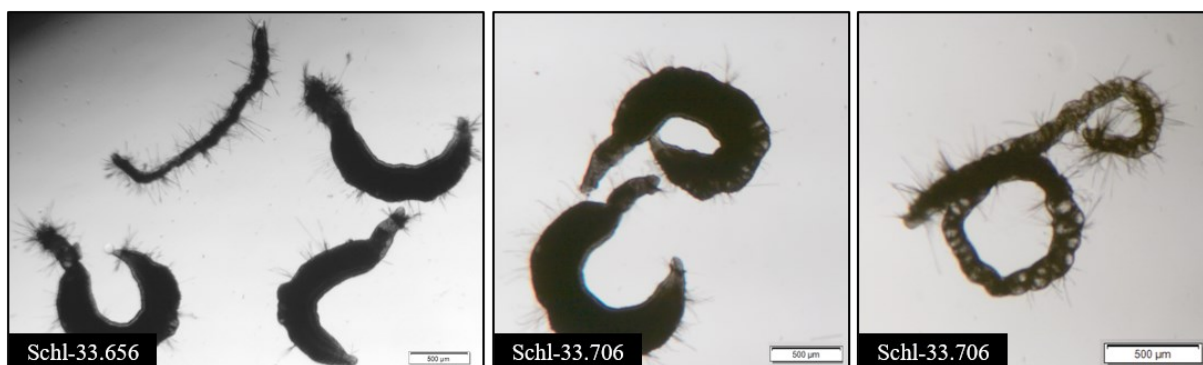
scheiterten damit alle Versuche die Phenoether **Schl-33.656**, **Schl-33.664** und **Schl-33.706** in die entsprechenden Phenole zu überführen (**Tab. 47**).

**Tabelle 47:** Strukturformeln und Ausbeuten der Phenolderivate mit variablen Substituenten in 5-Position



R' =	Ausbeute [%]	R' =	Ausbeute [%]
 <b>Schl-33.710</b>	36	 <b>Schl-33.590</b>	29

Die Phenol-Derivate **Schl-33.710** und **Schl-33.590** waren unter den Assay-Bedingungen unauffällig und zeigten keinerlei Wirkung. Der Ersatz der Nitro-Gruppe am 2-Hydrox-5-nitrobenzyl-Rest war damit dennoch erfolgreich, führten die halogenierten Phenoether **Schl-33.656** und **Schl-33.706** im Gegensatz zu dem 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Derivat **Schl-33.004** mit 1-(Methylsulfonyl)piperazin-Rest doch erst zu einer antischistosomalen Aktivität.



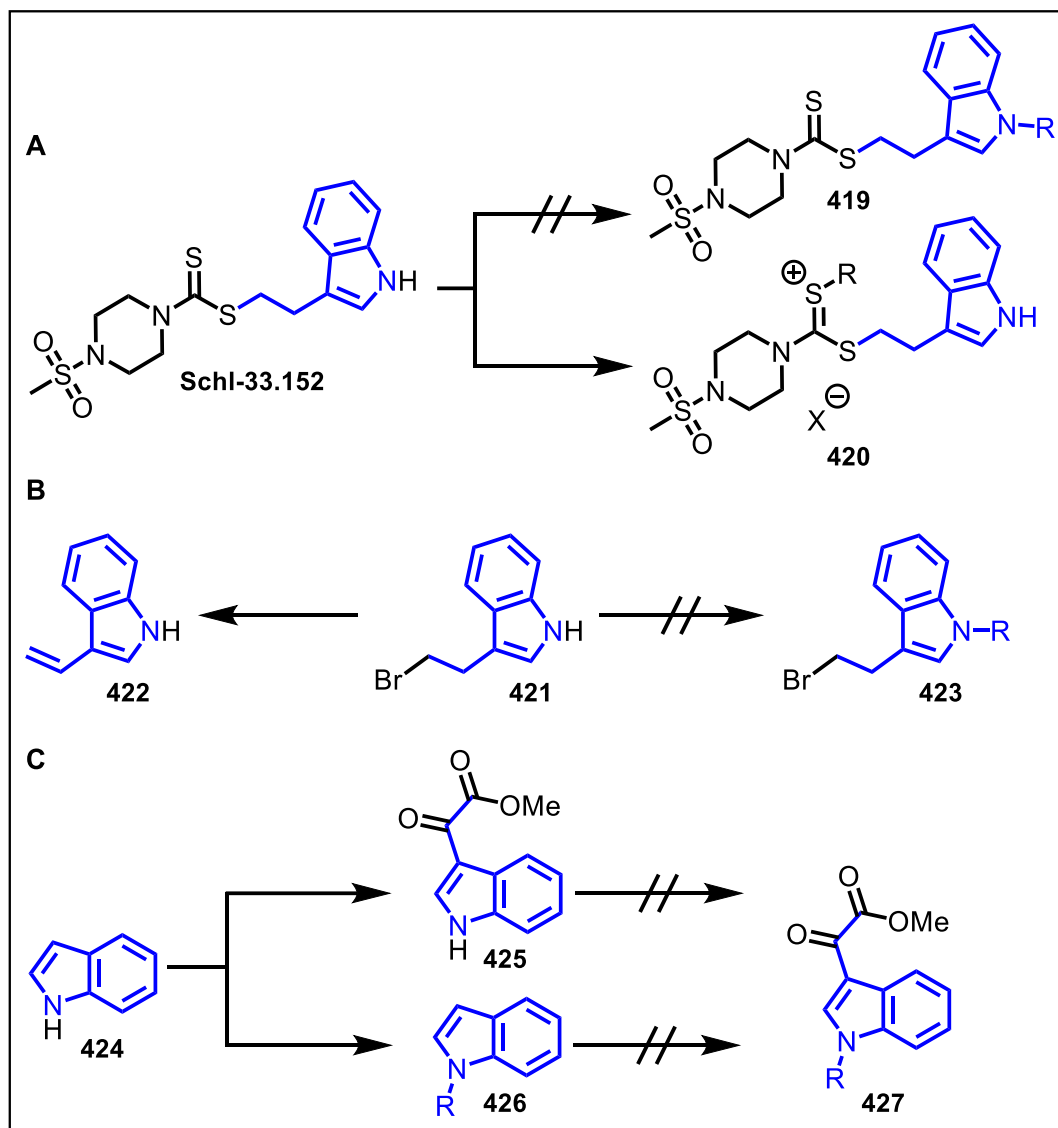
**Abbildung 169:** Exemplarische Phänotypen der 2-Methylphenoether-Derivate mit Halogenatom in 5-Position gemäß **Tab. 46** nach 72 h bei 10 µM; **Schl-33.656/706:** Männchen und Weibchen mit nadelförmigen Tegumentveränderungen (Igelform), stark dunkel verfärbt, bei **Schl-33.706** sowohl Männchen (halbmondförmig angeordnet) als auch Weibchen (brezelförmig angeordnet) mit zum Teil schweren Darmdilatationen und Strukturverlust

### 3.9 Indol-Derivate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf der Seite des einfach gebundenen Schwefelatoms in der Dithiocarbamat-Verbindung nicht nur der Ersatz der Nitrogruppe in *para*-Position des Benzylrestes vorgenommen. Ferner wurde versucht, den Benzylsubstituenten in seiner Gesamtheit zu ersetzen. Indole hatten sich bereits in der Arbeit von P. MÄDER als eine mögliche Alternative herauskristallisiert.<sup>[286]</sup> Der Indolbaustein wurde aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten, Strukturmodifikationen durchführen zu können, ausgewählt. Er ist anders geartet als die bisher verwendeten Reste. Gegenüber den Benzylderivaten mit einem elektronenziehenden Substituenten ist das Indol elektronenreich. Ferner waren alle bisher verwendeten Indol-Derivate über einen Ethyllinker in der 3-Position mit dem Schwefelatom verknüpft und verfügten damit über einen um eine Methylen-Einheit verlängerten Arm. Das aromatische System selbst ist gegenüber den Benzyl-Derivaten auch größer.

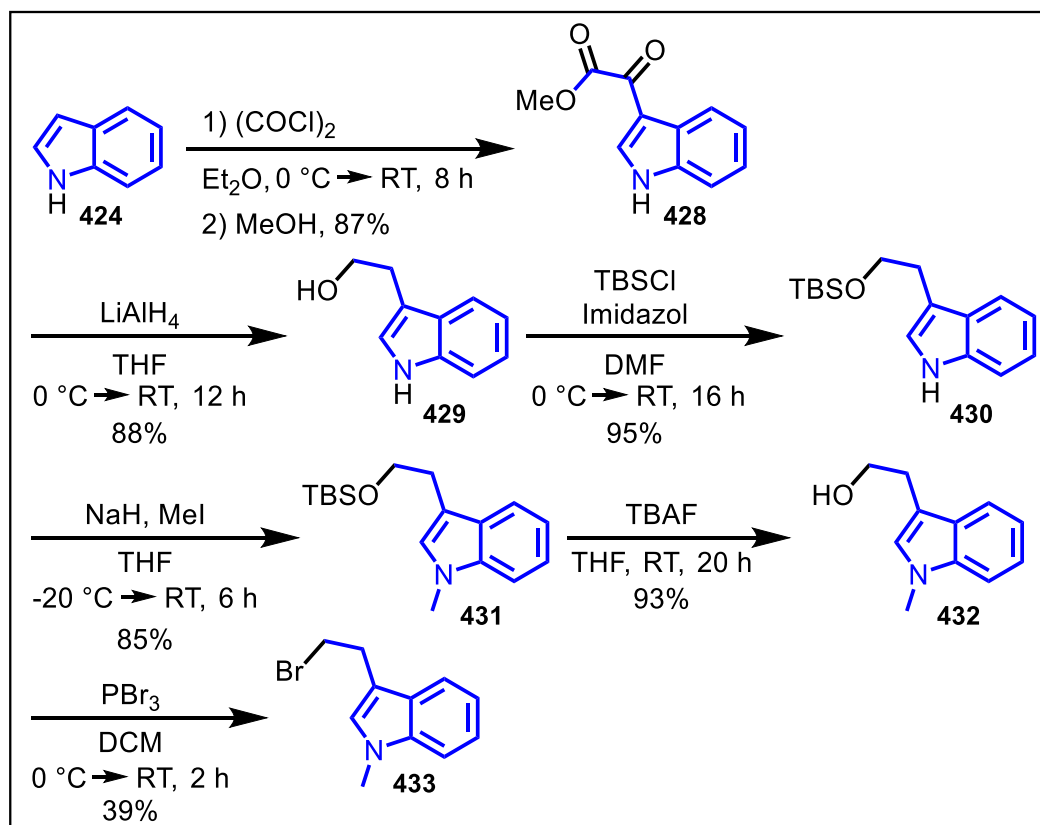
Zur Klärung etwaiger elektronischer Einflüsse war es naheliegend, das Stickstoffatom des Indols zu substituieren und damit das aromatische System elektronenreicher bzw. elektronenärmer zu machen. Hierzu bieten sich dessen Alkylierung, Acylierung sowie Sulfonylierung an. Aufgrund der Tatsache, dass das Indol nicht in Anwesenheit der Dithiocarbamatfunktion derivatisierbar ist und auch das entsprechende kommerziell erhältliche Bromid keinen sinnvollen Ansatzpunkt für eine Synthese darstellt, musste die Derivatisierung ausgehend von Indol erfolgen. Im ersten Fall führt die Umsetzung mit insbesondere Alkylhalogeniden zu den bereits beschriebenen 2-Iminium-1,3-dithiolan-Salzen (**420**) (**Schema 93, A**). Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Reaktion unter Verwendung von nicht nucleophilen Basen wie Lithiumdiisopropylamid ( $pK_s = 35,7$ ) erfolgte; ansonsten wäre eine nucleophile Substitution am Dithiocarbamat gleichwohl möglich. Eine basenkatalysierte Reaktion am 3-(2-Bromethyl)-1*H*-indol (**421**) hat eine Eliminierungsreaktion und die Bildung des durchweg konjugierten 3-Vinyl-1*H*-indols **422** zur Folge, das sehr stabil ist (**Schema 93, B**). So wurde Indol (**424**) zunächst mit Ethan-, Butan-, Cyclopropan-, Cyclohexan-, Benzol- und Biphenylsulfonsäurechlorid in Tetrahydrofuran oder Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Als Base dienten dabei sowohl Natriumhydrid als auch ein Gemisch aus Natriumhydroxid und dem Phasentransferkatalysator Tetrabutylammoniumiodid. Die 1-(Aryl-/Alkylsulfonyl)-1*H*-Indole (**426**) konnten mit einer Ausbeute von 14-64% erhalten werden. Die sulfonylierten Indole waren dann aber zu unreaktiv und ließen sich nicht weiter umsetzen. Daran änderte auch ein Austausch des Lösungsmittels und eine höhere Reaktionstemperatur sowie die Verwendung einer Lewissäure als Katalysator nichts. Letztere sollte die Carbonylaktivität durch Koordination an das Carbonylsauerstoffatom erhöhen. Damit

konnte der Linker in der 3-Position auf diesem Wege also nicht eingeführt werden. Auch die Umkehrung der Reihenfolge und damit die Reaktion über **425** brachte keinen Erfolg. Zwar konnte im ersten Schritt der Linker erfolgreich aufgebaut werden, jedoch scheiterte dann die Sulfonylierung des Stickstoffatoms (**Schema 93, C**).



**Schema 93:** Synthesestrategien und gescheiterte Versuche zur Substitution des Stickstoffatoms im Indolbaustein. Stattdessen gelang die Alkylierung des Indolbausteins mit Methyljodid nach einer Synthesevorschrift von HAN *et al.* in einer 6-stufigen Synthesesequenz.<sup>[582]</sup> Hierzu wurde an 1H-Indol (**424**) zunächst eine elektrophile aromatische Substitution mit Oxalylchlorid zu einem  $\alpha$ -Ketocarbonsäurechlorid durchgeführt. Dieses wurde mit Methanol in den entsprechenden Methylester **428** überführt. Die Reaktion erfolgte ausschließlich in der 3-Position. Die Selektivität kann dadurch erklärt werden, dass bei der Reaktion in 3-Position nur das Enamin-System involviert ist. Die Aromatizität des Benzolrings bleibt während der Reaktion erhalten. Die entstehende positive Ladung des Intermediats wird hauptsächlich durch das Stickstoffatom

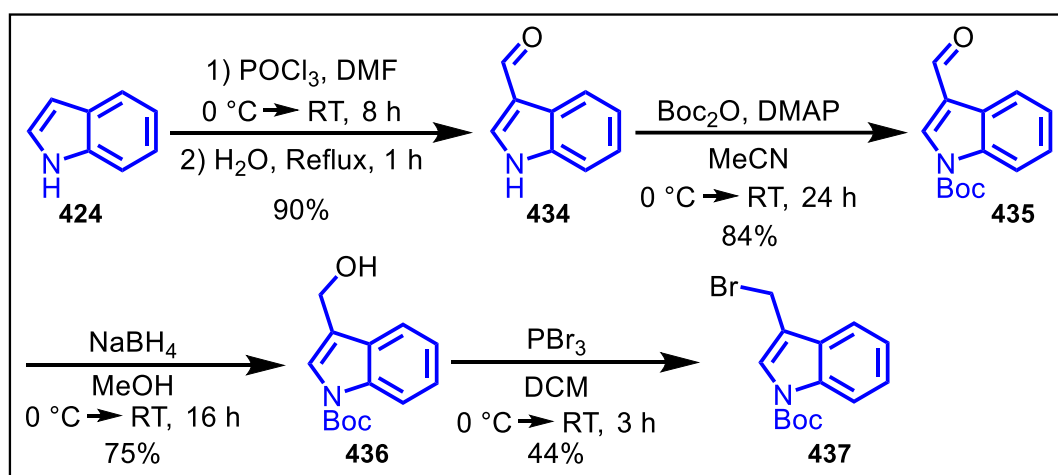
stabilisiert. Der  $\alpha$ -Ketocarbonsäureester **428** wurde darauffolgend mit 4 Äquivalenten Lithiumaluminiumhydrid behandelt. Dabei wurde die Estergruppe zur Hydroxylgruppe und die Ketogruppe zur Methylengruppe reduziert. Nach wässriger Aufarbeitung wurde das Indol-Derivat **429** mit Ethanolseitenkette erhalten. Der Alkohol wurde nun mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zu einem Silylether (**430**) umgesetzt und so vor dem Alkylanz geschützt, welches im weiteren Verlauf Verwendung fand. Dabei gilt, dass mit steigender sterischer Hinderung am Silicium-Atom auch die Stabilität der Schutzgruppe steigt. Bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde im nächsten Schritt der Reaktionssequenz die Deprotonierung des Indolstickstoffatoms ( $\text{pK}_\text{s} = 21,0$ ) mit Natriumhydrid ( $\text{pK}_\text{s} = 35,0$ ) vorgenommen und das unter Wasserstoffentwicklung entstehende Anion mit Methyljod als Elektrophil abgefangen. Es entstand Verbindung **431**. Die Silylschutzgruppe wurde sodann selektiv durch Fluorid-Ionen gespalten. Als Fluorid-Quelle diente Tetrabutylammoniumfluorid. Die entschützte Alkoholfunktion von **432** wurde abschließend mit Phosphortribromid in das Bromid **433** überführt, das in einem siebten Schritt wiederum mit 1-(Methylsulfonyl)piperazin und Kohlenstoffdisulfid zur Reaktion gebracht und in das Dithiocarbamat überführt wurde (**Schema 94**).



**Schema 94:** Syntheseroute zur Darstellung von *N*-substituierten Indol-Derivaten

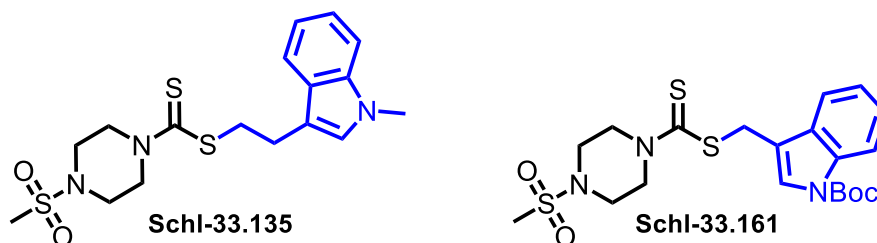
Nicht nur die Substitution am Stickstoffatom des Indols wurde vorgenommen. Auch die Länge des zum Schwefelatom des Dithiocarbamats ausgebildeten Linkers wurde variiert und um eine Methyleneinheit verkürzt. Die Synthese orientierte sich an einer Vorschrift von NETZ *et al.*<sup>[583]</sup>

Dimethylformamid wurde zunächst mit Phosphoroxychlorid bei 0 °C gerührt. Dabei bildet sich durch nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms vom Formamid auf das Phosphoratom von POCl<sub>3</sub> letztlich das sogenannte *Vilsmeier*-Reagenz, ein Chloriminium-Ion. Nach Zugabe von Indol (**424**) reagiert dieses in einer elektrophilen aromatischen Substitution über ein  $\alpha$ -Chloramin nach wässriger Aufarbeitung zum Aldehyd **434**. Der 1-*H*-Indol-3-carbaldehyd wurde im zweiten Schritt der Reaktion mittels Di-*tert*-butyldicarbonat und 4-(Dimethylamino)pyridin als nucleophilem Katalysator Boc-geschützt. Es folgte die Reduktion der Aldehyd-Funktion von **435** mittels Natriumborhydrid zum Alkohol **436** und schließlich dessen Bromierung mit PBr<sub>3</sub> zum Boc-geschützten 3-(Brommethyl)-1*H*-indol (**437**) (**Schema 95**). Es schloss sich auch hier die *one-pot*-Synthese mit CS<sub>2</sub> zum Dithiocarbamat-Derivat an.



**Schema 95:** Syntheseroute zur Darstellung von Indol-Derivaten mit verkürztem Linker über eine *Vilsmeier*-Formylierung von Indol

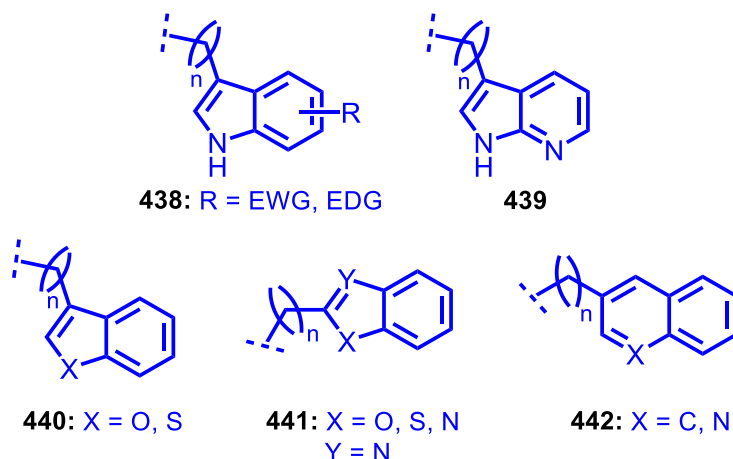
Das methylierte (**Schl-33.135**) und das um eine Methyleneinheit verkürzte und Boc-geschützte Indol-Derivat **Schl-33.161** wurden schließlich ebenfalls auf ihre Wirksamkeit gegenüber den Schistosomen getestet, waren aber nicht wirksam (**Abb. 170**).



**Abbildung 170:** Erfolgreich dargestellte Indol-Derivate

Weitere Ansätze zur Optimierung der Indole, die in Teilen schon begonnen wurden, stellen neben der Alkylierung, Acylierung oder Sulfonylierung auch die Substitution des anellierten 6-Rings mit elektronenziehenden oder -schiebenden Gruppen dar (**438**). Insbesondere hier ist ein noch viel größerer synthetischer Aufwand von Nöten, da das Indol selbst durch beispielsweise eine Fischer-Indolsynthese aus Phenylhydrazin und einem Aldehyd in

Gegenwart eines sauren Katalysators erst aufgebaut werden muss. Ferner ist auch die Synthese eines 7-Azaindols (**439**) denkbar. Das Stickstoffatom im 1*H*-Indol könnte zudem auch gegen ein anderes Heteroatom wie Sauerstoff oder Schwefel ersetzt und damit das Indol-Gerüst gegen Benzofuran oder Benzothiophen (**440**) ausgetauscht werden. Dies trifft auch auf die Darstellung eines über die 2-Position verknüpften Benzofurans, Benzothiophens oder Benzimidazols (**441**) zu. Als letzte Möglichkeit bleibt der Austausch des anellierten 5-Rings gegen einen 6-Ring. Hier ergeben sich dann Verbindungen wie Naphthalin oder Chinolin (**442**) (**Abb. 171**). Eine alternative Syntheseroute zur Darstellung *N*-sulfonylierter Indole mit Ethyllinker in 3-Position, die in Folgearbeiten ebenso überprüft werden könnte, geht von 1*H*-Indol-3-carbaldehyd aus, das zunächst mit einem Sulfonsäurechlorid umgesetzt wird. Es folgt eine *Wittig*-Reaktion und einer Hydroborierung des resultierenden Alkens zum Alkohol, der dann wiederum bromiert werden könnte.



**Abbildung 171:** Weitere Möglichkeiten zur Optimierung der Indol-Derivate

### 3.10 Endstufen-Synthesen im größeren Maßstab (*Scale-up*)

Am Anfang der Entwicklung eines Wirkstoffes steht zunächst (sieht man einmal von *trial and error* Testungen ab) die Identifizierung und Validierung eines Targets (z.B. eines Rezeptors, Enzyms, Ionenkanals), an dem ein potenzieller Wirkstoff ansetzen kann, mit dem Ziel den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen. Hierzu ist das Verständnis von Krankheitsprozessen auf molekularbiologischer Ebene essenziell, um eine Hypothese zu erarbeiten, auf welcher Stufe des Krankheitsgeschehens durch Aktivierung oder Inhibition eines Zielmoleküls oder Reaktionspfades ein therapeutischer Effekt zu erwarten ist. Es folgt eine breit angelegte Suche nach biologisch aktiven Verbindungen in einem zuvor etablierten *in-vitro*-Testsystem (z.B. an einem isolierten Enzym oder an Membranhomogenaten für Rezeptorbindungsstudien), indem Moleküle mit möglichst diversen Eigenschaften auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Dies geschieht oftmals unter Zuhilfenahme von Vorbildern aus der Natur oder Verbindungen mit bekanntem Wirkprinzip. Dabei werden erste Hits, also wechselwirkende Substanzen ermittelt. Ist eine Verbindung gefunden, gilt es diese dann hinsichtlich ihrer Wirkung und damit der Bindung zum Zielmolekül in mehreren Zyklen von Synthese und Testung zu optimieren (*hit to lead optimization*). Je größer die Bindung einer etwaigen Verbindung an ein bestimmtes Zielmolekül ist, desto größer ist auch die dadurch hervorgerufene Wirkung. Hierbei gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen. Ist die Struktur des Targetmoleküls unbekannt, so muss das Molekülgerüst eines aufgefundenen Treffers durch den Austausch einzelner Struktur motive kleinschrittig verändert und der chemische Strukturraum so ausgelotet werden. Über die unterschiedlichen Derivate und deren jeweilige Wirkung gegenüber dem Target (Struktur-Aktivitäts-Beziehungen) lässt sich letztlich dann zumindest in begrenzter Weise auch auf die Bindungsstelle schließen und der Pharmakophor bestimmen. Jene Methode wird als Ligandenbasiert bezeichnet. Ist die dreidimensionale Gestalt des Targets hingegen durch beispielsweise Kristallstrukturanalysen bekannt, so lässt sich ein passgenauer Ligand auch nach vorangegangenem *virtual screening* computergestützt modellieren (*de novo design*). Dabei kann ein Ligand aus einem Fragment stetig erwachsen. Außer der Optimierung der Wirkstärke gilt es auch die Selektivität der Wirkung und die pharmakologischen sowie physikochemischen Eigenschaften zu verbessern, indem Struktur-Eigenschafts-Beziehungen erarbeitet werden. Auf diesem Weg werden zunächst Leitstrukturen entdeckt, die im Weiteren dann durch vertiefte biologische Testung (*ex vivo* und *in vivo*) zu einem Wirkstoffkandidaten entwickelt werden. Dabei werden auch Metaboliten aufgeklärt und unbeabsichtigte Wechselwirkungen, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, untersucht. In der abschließenden präklinischen Phase wird schließlich die Wirksamkeit des Wirkstoffkandidaten in geeigneten Krankheitsmodellen



(z.B. einer Knockout-Maus) überprüft. Ebenfalls wird die Unbedenklichkeit anhand von umfassenden toxikologischen Prüfungen zumeist an mehreren Säugetierarten getestet (z.B. Akuttoxizität von Einzeldosen, Toxizität bei wiederholter Gabe über einen längeren Zeitraum, Sicherheitspharmakologietests zur Überprüfung auf Wechselwirkungen mit lebenswichtigen Organsystemen, Tests auf lokale Verträglichkeit). Übersteht ein Wirkstoffkandidat die präklinische Phase, muss er in geeigneten klinischen Prüfungen erstmals am Menschen erprobt werden. Die klinischen Studien sind dabei in die verschiedenen Phasen I-III gegliedert, wobei die Anzahl an Testpersonen stetig wächst. Dabei werden zunächst ausschließlich gesunde Probanden untersucht. Während anfänglich die Sicherheit und Verträglichkeit sowie die Messung pharmakokinetischer Werte im Vordergrund steht, kommt es im weiteren Verlauf zur Überprüfung des Therapiekonzepts und der Bestimmung der geeigneten Therapiedosis sowie einem signifikanten Wirksamkeitsnachweis in einer randomisierten Doppelblindstudie. Parallel zur präklinischen Forschung wird der Wirkstoffkandidat in einer geeigneten Arzneiform verarbeitet. Dieser Prozess ist der pharmazeutischen Technologie (Galenik) zuzuschreiben. Sind alle Hürden erfolgreich genommen, entscheidet die Arzneimittelbehörde über die Zulassung und damit die Markteinführung als Arzneimittel. Selbst nach der Markteinführung erfolgen dann noch weitere Testungen (Phase-IV-Studien) zur Feststellung von Langzeitfolgen und sehr seltener Nebenwirkungen, die erst in großen Patientenkollektiven zu erfassen sind.

Die Entwicklung eines Wirkstoffs ist damit also ein langwieriger (12-15 Jahre) und zugleich kostspieliger Prozess (etwa 1 Milliarden Dollar), der spätestens ab der präklinischen Phase Industrie-gestützt verläuft und mit zahlreichen Fehlschlägen verbunden ist (nur etwa 10% der Kleinmolekülprojekte schaffen den Schritt bis hin zum Wirkstoffkandidaten; etwa 10% der Kandidaten, die in die klinische Phase I gehen, erlangen die Marktreife). Dabei werden unzählige Verbindungen getestet (etwa 120.000 bis  $10^6$  Verbindungen zur Auffindung eines Hits im HTS, mehrere 100 Verbindungen in der Phase vom Hit zur Leitstruktur und der anschließenden Optimierung).<sup>[584-587]</sup>

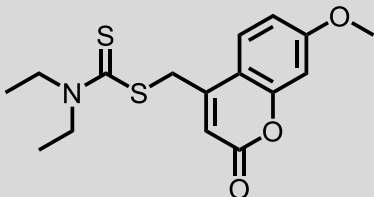
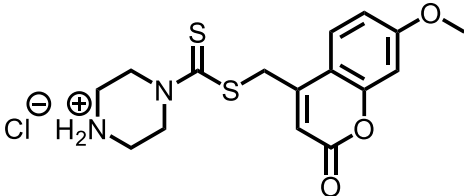

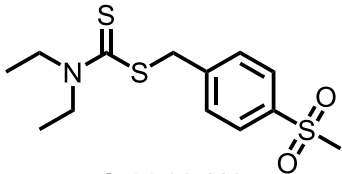
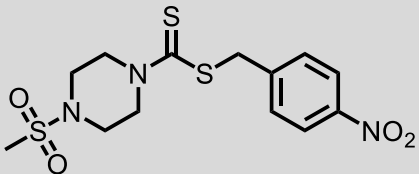
Je weiter die Entwicklung eines potenziellen Wirkstoffs voranschreitet, umso wichtiger werden auch Aspekte wie das *up-Scaling* von Syntheseansätzen, die der Prozesschemie zugeschrieben werden. Während erste *in-vitro*-Testungen im Regelfall Substanzmengen im Bereich von wenigen Milligramm bedürfen, wofür Synthesen im Mikromaßstab ausreichen, sind für eine weitergehende Profilierung (Testung gegen andere Erreger/Spezies, Erhebung von ADME-Tox-Parametern etc.) immer größere Substanzmengen von Nöten. Eine weitere Schwelle wird insbesondere dann überschritten, wenn es zur Testung am Gesamtorganismus Tier kommt.

Sodann werden mehrere hundert Milligramm bis Gramm an Substanz benötigt. Kommt es schließlich zur Erprobung einer Substanz in der klinischen Phase müssen mehrere Kilogramm an Substanz vorgehalten werden und damit Synthesen im Makromaßstab. Neben der Prozessthermodynamik spielen dann auch die Erforschung der Reaktionskinetik und des Gefahrenpotentials sowie die Frage nach der Wirtschaftlichkeit und Umweltverträglichkeit eine entscheidende Rolle. Dazu muss der Einfluss von Reaktionsparametern (z.B. Konzentration, Additionsrate, Temperatur, Lösungsmittel, Katalysator und pH-Wert) ermittelt werden, um Prozessabweichungen zu reduzieren und chemische Entwicklungszyklen zu verkürzen. Oftmals muss dabei auch die Syntheseroute zur Darstellung einer gewünschten Verbindung sorgfältig durchdacht und eventuell sogar durch eine alternative Route ersetzt werden, da sich Synthesen im Allgemeinen nicht ohne Ausbeutenverluste uneingeschränkt vergrößern lassen.

Auch in dieser Arbeit wurden erste Syntheseansätze im größeren Maßstab, als dem für die Derivatisierung zur Erstellung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen nötigen, durchgeführt, was demnach einen gewissen Wert für die Medizinalchemie darstellt. Die Synthesewege, also die einzelnen Reaktionen und ihre Abfolge zur Darstellung der Dithiocarbamat-Derivate wurde dabei nicht geändert. Es wurde lediglich auf die Syntheseführung Einfluss genommen. So wurde unter anderem die Menge der eingesetzten Edukte variiert. Dabei wurde insbesondere in Bezug auf die Darstellung der Dithiocarbamatfunktion in der *one-pot*-Reaktion mit Kohlenstoffdisulfid folgende Erkenntnis gewonnen: Wurde die Aminkomponente in möglichst wenig Acetonitril vorgelegt, so fiel das gewünschte Produkt aus dem polaren Lösungsmittel aus und konnte abgesaugt werden. Das Rohprodukt wurde dann, sofern erforderlich, an einer Kieselgelsäule (Maße: 20 cm Länge; 4 cm Durchmesser) gereinigt. Abschließend wurde aus Ethylacetat umkristallisiert. Die Boc-Entschützung im salzsauren Medium zur Darstellung von Hydrochloriden war ebenfalls unproblematisch (hier wurden Syntheseansätze bis zu 30 mmol durchgeführt). Auch hier ließ sich die Ausbeute durch die Menge an verwendetem Lösungsmittel gut steuern. In beiden Fällen wurden ähnlich gute Ausbeuten wie in der zuvor durchgeführten Synthese in kleinerem Maßstab erhalten. Teilweise fielen diese sogar besser aus. Auffällig war jedoch, dass sofern die 4-Position des in die Dithiocarbamat-Funktion eingebundenen Piperazin-Rings durch die Darstellung von Sulfonamiden, im Besonderen aber Carbonsäureamiden (durch die Umsetzung mit z.B. Aminosäuren) funktionalisiert wurde, es durchaus problematisch war, größere Substanzmengen zu erhalten. Selbes gilt für Umsetzung eines Amins und Kohlenstoffdisulfid mit dem 2-Hydrox-5-nitrobenzylbromid in der *one-pot*-Reaktion. In beiden Fällen mussten mehrere kleine Ansätze parallel durchgeführt werden, um letztlich größere Substanzmengen zu erhalten. Insgesamt wurden zahlreiche

Dithiocarbamat-Derivate (mehr als 27 Endstufen aus der Arbeit von *P. Mäder*) im Maßstab von > 2 g dargestellt. **Tabelle 48** zeigt die hinsichtlich der Stoffmenge größten Ausbeuten, die zwischen 7 mmol und 15 mmol liegen. Ein erstes *up-Scaling* der Synthese konnte somit also erfolgreich vorgenommen werden. Die erhaltenen Gramm-Mengen sind ausreichend um weitergehende Untersuchungen in der späten Phase der „Hit to Lead“-Entwicklung und der frühen Phase der Weiterentwicklung der Leitstruktur zum Entwicklungskandidaten durchzuführen.

**Tabelle 48:** Strukturformeln sowie Stoffmengen und Massen ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate, die im größeren Maßstab dargestellt wurden

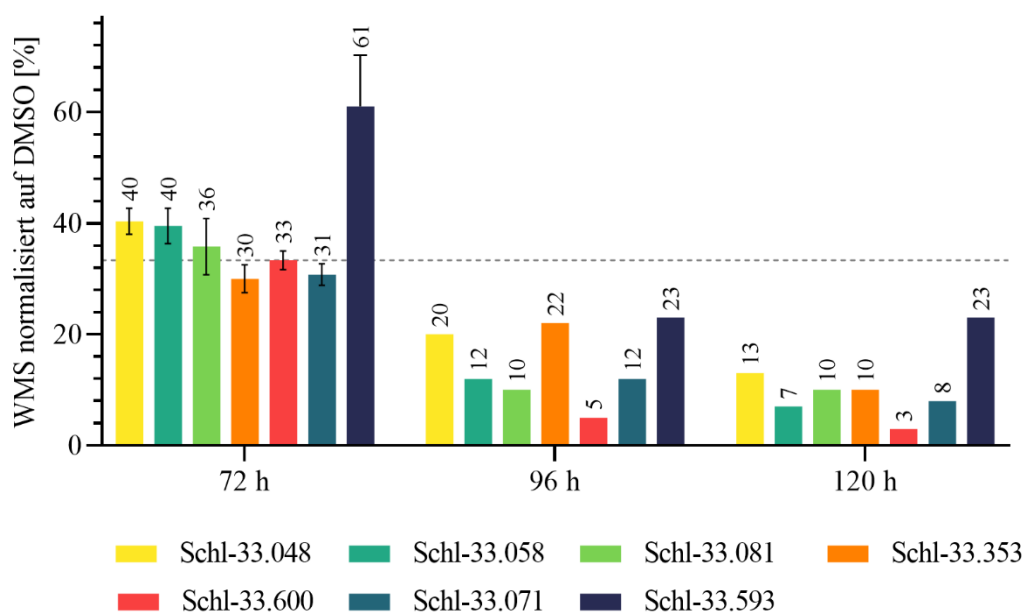
Strukturformel	n [mmol]	m (g)
 Schl-32.175	7.14	2.41
 Schl-32.324	7.98	3.09
 Schl-32.320	8.94	3.28
 Schl-32.118	10.14	3.22
 Schl-32.329	15.42	5.79

Da sich Kohlenstoffdisulfid als problematisch insbesondere in der Darstellung von Wirkstoffen erweist, was auf seine Eigenschaft als starkes Elektrophil zu wirken und damit verbundenen Toxizität zurückzuführen ist, das sich möglicherweise als Verunreinigung im Syntheseprodukt wiederfindet, wurden in dieser Arbeit auch erste Versuche mit Thiocarbonyldiimidazol als Ersatz für CS<sub>2</sub> durchgeführt und waren erfolgreich.

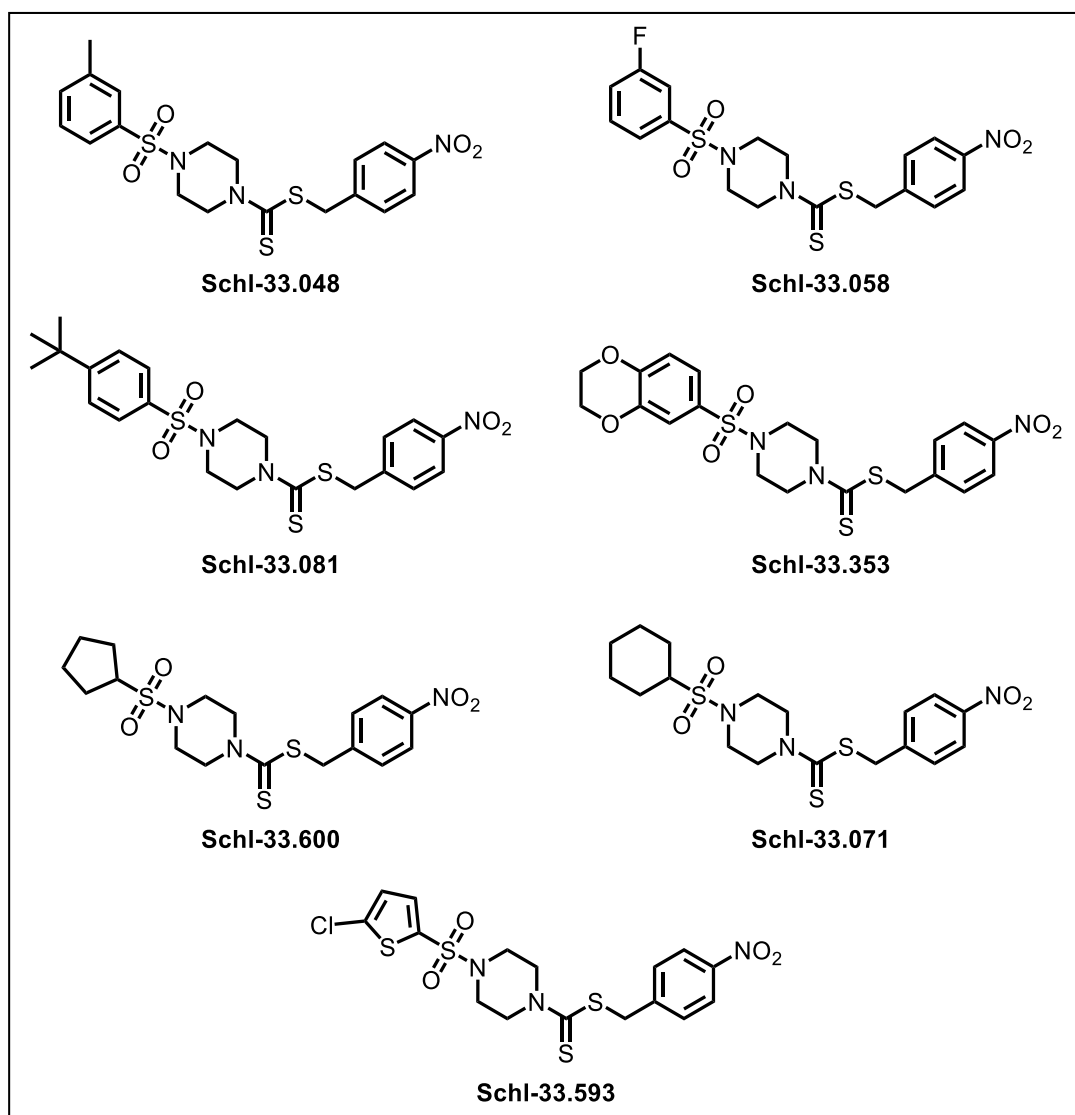
### 3.11 Weitergehende biologische Testungen

#### 3.11.1 *In-vitro*-Langzeittestungen

Alle bis 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie nicht zytotoxischen und zugleich deutlich antischistosomal-aktiven Verbindungen wurden weiteren Tests unterzogen. Zu diesen zählte auch die *in-vitro*-Testung an adulten Schistosomen von *S. mansoni* über einen längeren Zeitraum als den von 72 h (**Tabelle II**; S. 562). Primäres Ziel war dabei die Klärung, ob und wie stark sich der WMS mit fortschreitender Zeit veränderte. Ferner galt es, insbesondere den Beginn des Auftretens letaler Effekte zeitlich einzugrenzen bzw. zu klären, ab welchem Zeitpunkt womöglich alle Schistosomen dann auch tatsächlich tot waren. Die *in-vitro*-Langzeittestungen wurden als Einzelmessung vorgenommen, weshalb keinerlei Fehlerbalken in den Abbildungen aufgeführt sind (abgesehen von den 72-h-Zeitwerten). Es wurde bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet. **Abbildung 172** zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Sulfonamid-Derivate mit *para*-Nitrobenzyl-Rest (**Abb. 173**). Deutlich ist der Einfluss der verlängerten Versuchsdauer auf die Motilität bzw. Vitalität zu erkennen. Während nach 72 h nur drei von sieben Verbindungen (**Schl-33.353/600/071**) vereinzelt letale Effekte zeigen, sind nach insgesamt 96 h bei allen untersuchten Verbindungen letale Effekte zu beobachten. **Schl-33.593** verursacht dabei den stärksten Rückgang an Motilität um weitere 40% innerhalb des Zeitintervalls von 72 h auf 96 h. Relativ gesehen ist der Unterschied zwischen 72 h und 96 h bei **Schl-33.353** am geringsten. Er beträgt etwa ein Viertel. Bei **Schl-33.048** hingegen liegt der Unterschied bei genau der Hälfte und bei **Schl-33.058** sowie bei **Schl-33.071** bei etwa zwei Dritteln. Die Wirkung von **Schl-33.081** indessen geht um etwa drei Viertel gegenüber dem 72 h-Wert zurück und die Wirkung von **Schl-33.600** ist mit etwa fünf Sechsteln am stärksten von einem zeitlichen Fortgang betroffen. Während die Verbindungen **Schl-33.081** und **Schl-33.593** nach 96 h keine Veränderung in der Motilität mehr zeigen, fällt die Motilität bei **Schl-33.071** und **Schl-33.048** nochmals um etwa ein Drittel ab. Bei **Schl-33.058**, **Schl-33.353** und **Schl-33.600** liegt der Rückgang der Motilität von 96 h auf 120 h bei etwa 50% und ist damit am stärksten ausgeprägt. Am deutlichsten wird die Motilität über 120 h durch das Cyclopentylsulfonamid **Schl-33.600** eingeschränkt. Hier zeigen zuletzt nur noch zwei von zwanzig Würmern eine minimale Kopf-/Schwanzbewegung.



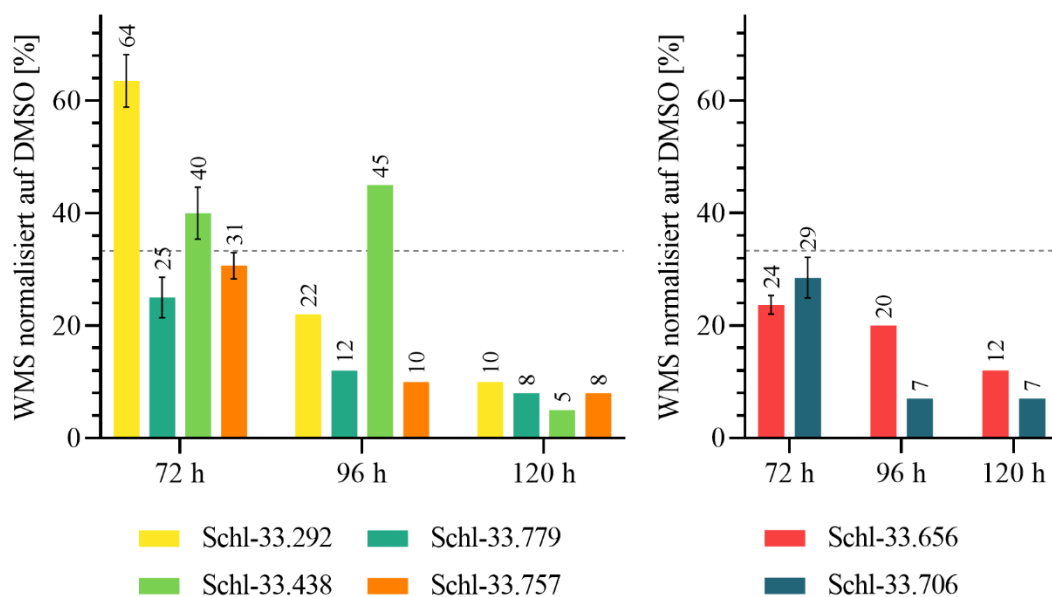
**Abbildung 172:** Motilität der Dithiocarbamat-Derivate mit Sulfonamid-Teilgerüst und *para*-Nitrobenzyl-Rest bei 10  $\mu$ M nach 72, 96 und 120 Stunden



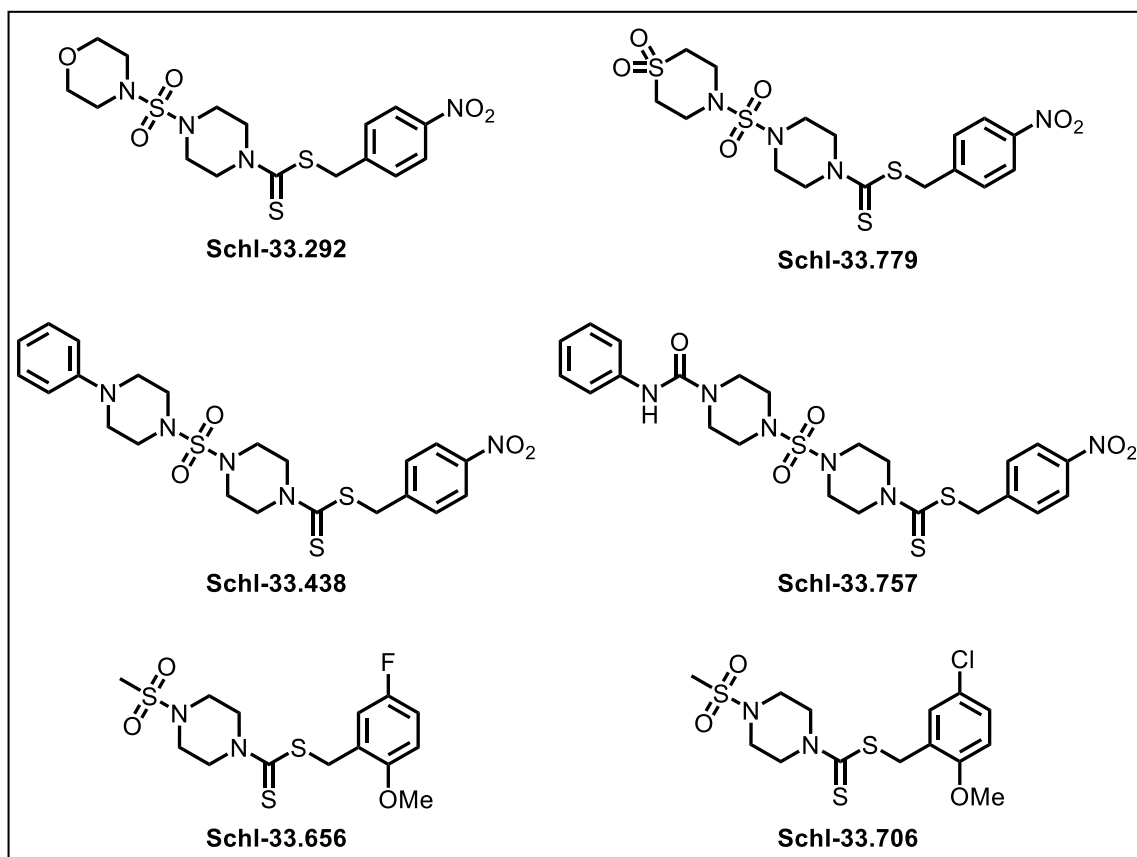
**Abbildung 173:** Strukturformeln der untersuchten Dithiocarbamat-Derivate mit Sulfonamid-Teilstruktur und *para*-Nitrobenzyl-Rest

Auch bei den Dithiocarbamat-Derivaten mit Schwefelsäurediamid-Teilstruktur und *para*-Nitrobenzyl-Rest gemäß **Abb. 175** hatten weitere 24 h mit Ausnahme von **Schl-33.438** noch einen deutlichen Effekt auf die Motilität (**Abb. 174**). So nahm diese bei **Schl-33.779** nochmals um etwa die Hälfte ab. Bei **Schl-33.292** und **Schl-33.757** waren es sogar zwei Drittel. Den größten Rückgang mit bis zu 40% verzeichnete man bei **Schl-33.292**. In dem Zeitintervall von 96 h bis 120 h waren alle der vier genannten Verbindungen letal. Die Würmer zeigten eine Restmotilität zwischen 5% und 10%, was bedeutet, dass drei bis fünf von zwanzig Wurmern einen *motility score* von eins besitzen. Den geringsten Unterschied gegenüber dem Zeitpunkt von 96 h erfuhr **Schl-33.757**. Die Motilität ging hier um etwa ein Fünftel zurück. Bei **Schl-33.779** waren dies etwa ein Drittel und bei **Schl-33.292** etwa 50%. Am deutlichsten machten sich die letzten 24 h bei **Schl-33.438** mit einem Unterschied von bis zu 90% bemerkbar.

Die beiden 1-(Methylsulfonyl)piperazinamid-Derivate mit 2-Methoxy-5-fluorbenzyl-Rest (**Schl-33.656**) bzw. 2-Methoxy-5-chlorbenzyl-Rest (**Schl-33.706**) wirkten bereits nach 72 h letal. Dennoch zeigte sich auch hier innerhalb von weiteren 48 h noch eine Änderung in der Motilität. Diese lag bei 50% bzw. 75%, wobei ein Unterschied bei **Schl-33.706** bereits innerhalb weiterer 24 h auftrat. Das Chlor-Derivat wirkte über den Gesamtzeitraum von 120 h etwas besser als das Fluor-Derivat, obwohl das Fluor-Derivat nach 72 h zunächst noch aktiver war.



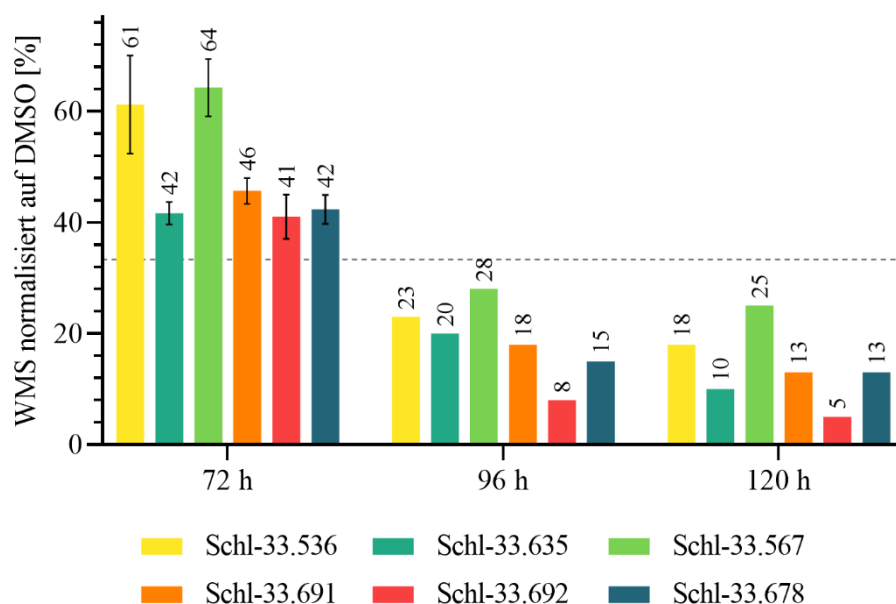
**Abbildung 174:** links: Motilität der Dithiocarbamat-Derivate mit Schwefelsäurediamid-Teilgerüst und *para*-Nitrobenzyl-Rest; rechts: Motilität der Dithiocarbamat-Derivate mit 1-(Methylsulfonyl)-piperazin- und 2-Methoxy-5-Fluor bzw. 2-Methoxy-5-chlorbenzyl-Rest (bei 10  $\mu$ M nach 72, 96 und 120 Stunden)



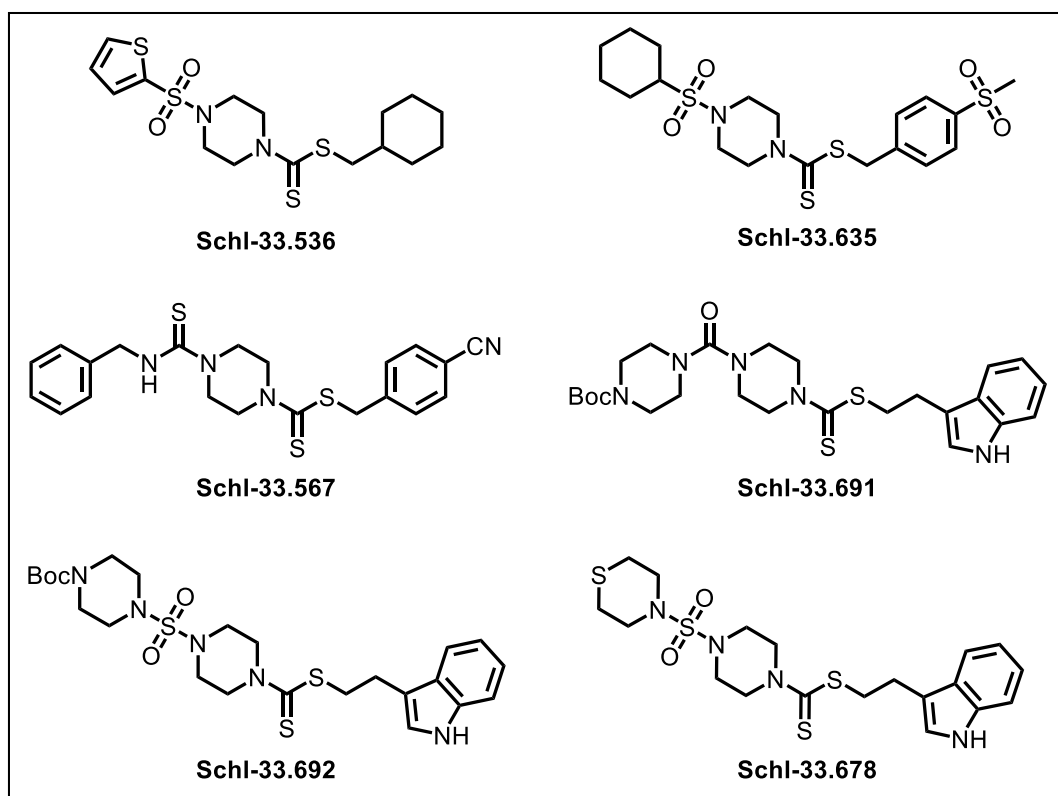
**Abbildung 175:** Strukturformeln der untersuchten Dithiocarbamat-Derivate mit Schwefelsäurediamid-Teilstruktur und *para*-Nitrobenzyl-Rest sowie mit 1-(Methylsulfonyl)piperazin und 2-Methoxy-5-fluor- bzw. 2-Methoxy-5-chlorbenzyl-Rest

Ähnliche Trends wurden auch für das Sulfonamid **Schl-33.536** mit Cyclohexylmethyl-Rest und das Benzylthioharnstoff-Derivat **Schl-33.567** mit *para*-Cyanbenzyl-Rest beobachtet (**Abb. 176+177**). Beide erreichten eine bis zu 75%-ige Inhibition nach 96 h (ausgehend von einer 40-45%-igen Reduktion der Motilität nach 72 h). Im Falle von **Schl-33.536** wurde die Motilität innerhalb der letzten 24 h nochmals um etwa 5% reduziert, wohingegen sie bei **Schl-33.567** annähernd konstant blieb. Für das Cyclohexylsulfonamid **Schl-33.635** mit *para*-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest, das Boc-Piperazinyl-Harnstoff-Derivat **Schl-33.691** mit 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest und das Schwefelsäurediamid **Schl-33.678** aus Thiomorpolin ging die Motilität indessen von einem Wert um etwa 40-45% Restmotilität aus. Sie erreichte dann Motilitäts-Endwerte von etwa 10-15%, wobei ein Abfall von 20-25% innerhalb des Zeitraums von 72 h auf 96 h zu verzeichnen war. Die wirksamste Verbindung dieser Reihe war das Schwefelsäurediamid-Derivat **Schl-33.692** mit Boc-Piperazinyl- und 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest; sie führte nach 72 h zu einer Reduktion der Motilität um etwa 60%, nach 96 h zu einer Reduktion von etwa 90% und nach 120 h dann zu einer Abnahme von bis zu 95%.





**Abbildung 176:** Motilität weiterer ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate bei 10 µM nach 72, 96 und 120 Stunden



**Abbildung 177:** Strukturformeln weiterer untersuchter Dithiocarbamat-Derivate

Die Inkubation der Schistosomen mit den Inhibitoren über den Zeitraum von 72 h hinaus führte in seiner Gesamtheit letztlich bei allen Derivaten zu einem weiteren Abfall der Motilität. Im Zeitraum von 72 h bis 96 h war dabei ein größerer Zugewinn an Aktivität zu verzeichnen als im letzten Zeitintervall von 96-120 h. Eine 100%-ige Reduktion der Motilität und damit ein ausnahmslos letaler Effekt wurde jedoch durch keines der Derivate verursacht (zumindest nicht bei den eingesetzten Inhibitorkonzentrationen). Die Restmotilität lag im Schnitt zwischen

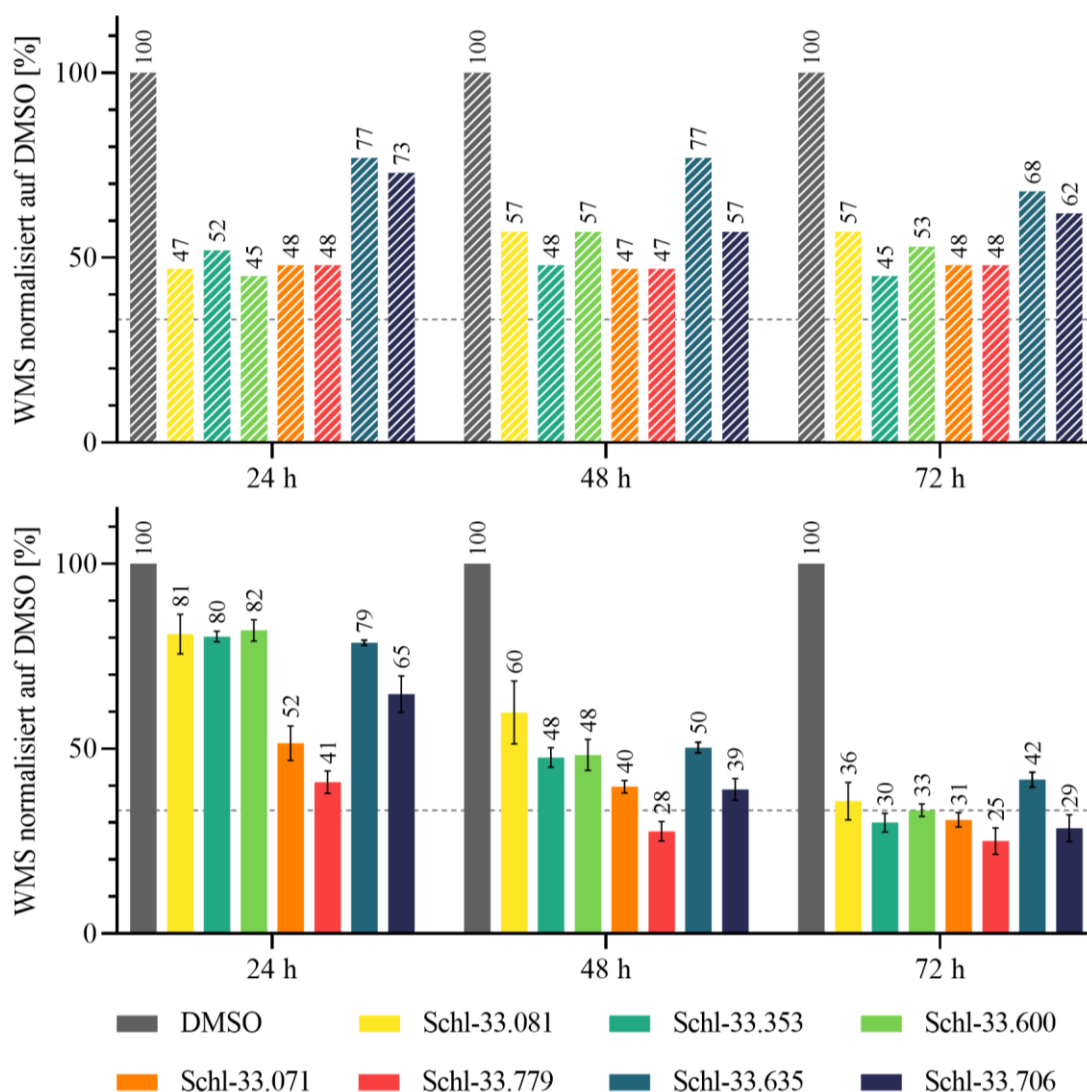
5% und 10% (also siebzehn bzw. vierzehn Würmern überlebten nicht), in Ausnahmefällen auch bei mehr als 15%. Phänotypen wie Tegumentschäden und Darmdilatationen nahmen über den 72 h-Wert hinaus nur unwesentlich an Intensität zu.

### 3.11.2 Inhibitor-Auswaschung

Zusätzlich zur *in-vitro*-Langzeittestung wurde auch eine Auswaschung der Inhibitoren mit den gleichen Verbindungen vorgenommen (**Tabelle III**; S. 567). Dazu wurden die Schistosomen zunächst über 24 h mit den Inhibitoren bei 10 µM inkubiert. Nach 24 h wurde der Inhibitor dann jeweils entfernt und die Würmer in unbehandeltes Nährmedium überführt, wo sie für weitere 48 h gehalten wurden. Die Würmer wurden dabei nicht von anhaftenden Resten an mit Inhibitor behandeltem Medium befreit, da ein „Waschen“ der Würmer diesen in anderen Versuchen nicht allzu gut bekommen war. Das Ziel dieser Versuche war die Klärung, inwieweit auftretende Inhibitoreffekte mit den neu synthetisierten Verbindungen reversibel sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass beispielsweise die zunächst durch Praziquantel verursachte Paralyse durch das Umsetzen der Schistosomen in ein Inhibitor-freies Nährmedium umkehrbar ist.<sup>[191]</sup> Ferner war zu prüfen, ob ein Zeitraum von 24 h bereits ausreicht, eine irreversible Schädigung der Würmer herbeizuführen. Es ist möglich, dass ein etwaiger Inhibitor sich innerhalb der ersten 24 h zunächst im Wurm anreichert und dann im weiteren zeitlichen Verlauf noch Aktivität am Wirkort entfaltet. Insgesamt zeigten zehn von neunzehn Verbindungen auch nach der Auswaschung noch deutliche antischistosomale Effekte. Dabei wirkten drei ausschließlich auf die Eiproduktion.

Vergleicht man die Motilität der Schistosomen, welche nach Behandlung mit dem 4-*tert*-Butylphenylsulfonamid **Schl-33.081**, dem 2,3-Dihydrobenzo-1,4-dioxin-6-sulfonamid **Schl-33.353** und dem Cyclopentylsulfonamid **Schl-33.600** resultieren, mit und ohne Auswaschung der Inhibitoren, so fällt auf, dass sich die Inhibition der Motilität nach 24 h um etwa 30% unterscheidet (**Abb. 178**). Sie ist bei der Testreihe der Auswaschung stärker ausgeprägt und nimmt Werte von etwa 50% an. Während die Inhibition nach dem Absetzen des Inhibitors bei **Schl-33.081** und **Schl-33.600** zunächst leicht (um etwa 10%) ansteigt, dann jedoch stagniert, nimmt sie bei **Schl-33.353** weiterhin ab (innerhalb der nächsten 48 h um etwa 10%). Gegenüber der Testreihe, bei der der Inhibitor nicht abgesetzt wurde, sind nach 48 h hinsichtlich der Motilität keinerlei Unterschiede mehr feststellbar. Ausschließlich die Inhibition der Motilität bei den zuvor mit **Schl-33.600** behandelten Schistosomen ist noch um etwa 10% stärker ausgeprägt. Nach insgesamt 72 h zeigen alle der kontinuierlich mit einem Inhibitor versetzten Schistosomen vereinzelt auch letale Effekte. Damit ist ihre Motilität 15-20% stärker eingeschränkt. Bei dem Cyclohexylsulfonamid **Schl-33.071** und dem Schwefelsäurediamid

**Schl-33.779** mit Thiomorpholin-Dioxid-Rest ist innerhalb der ersten 24 h kaum ein Unterschied der Motilität festzustellen, wenngleich **Schl-33.779** in den Testreihen ohne Auswaschung des Inhibitors etwa 10% stärker wirkte. In den nächsten 48 h war im Falle des Absetzens der Inhibitoren dann keinerlei Änderung mehr feststellbar; die Inhibition blieb konstant bei etwa 50%. Wirkten die Inhibitoren hingegen fortlaufend auf die Schistosomen ein, so führte dies im Falle von **Schl-33.071** zunächst zu einem weiteren Abfall der Motilität um etwa 20% und dann nochmal um 10%. Bei **Schl-33.779** war der Abfall nur halb so stark ausgeprägt. Dennoch wurden hier nach 72 h mit einer Restmotilität von 25% letale Effekte erzielt.



**Abbildung 178:** Motilität ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate bei 10  $\mu$ M nach 24, 48 und 72 Stunden; oben: mit Auswaschung des Inhibitors nach 24 h; unten: fortwährende Inhibitor-Behandlung

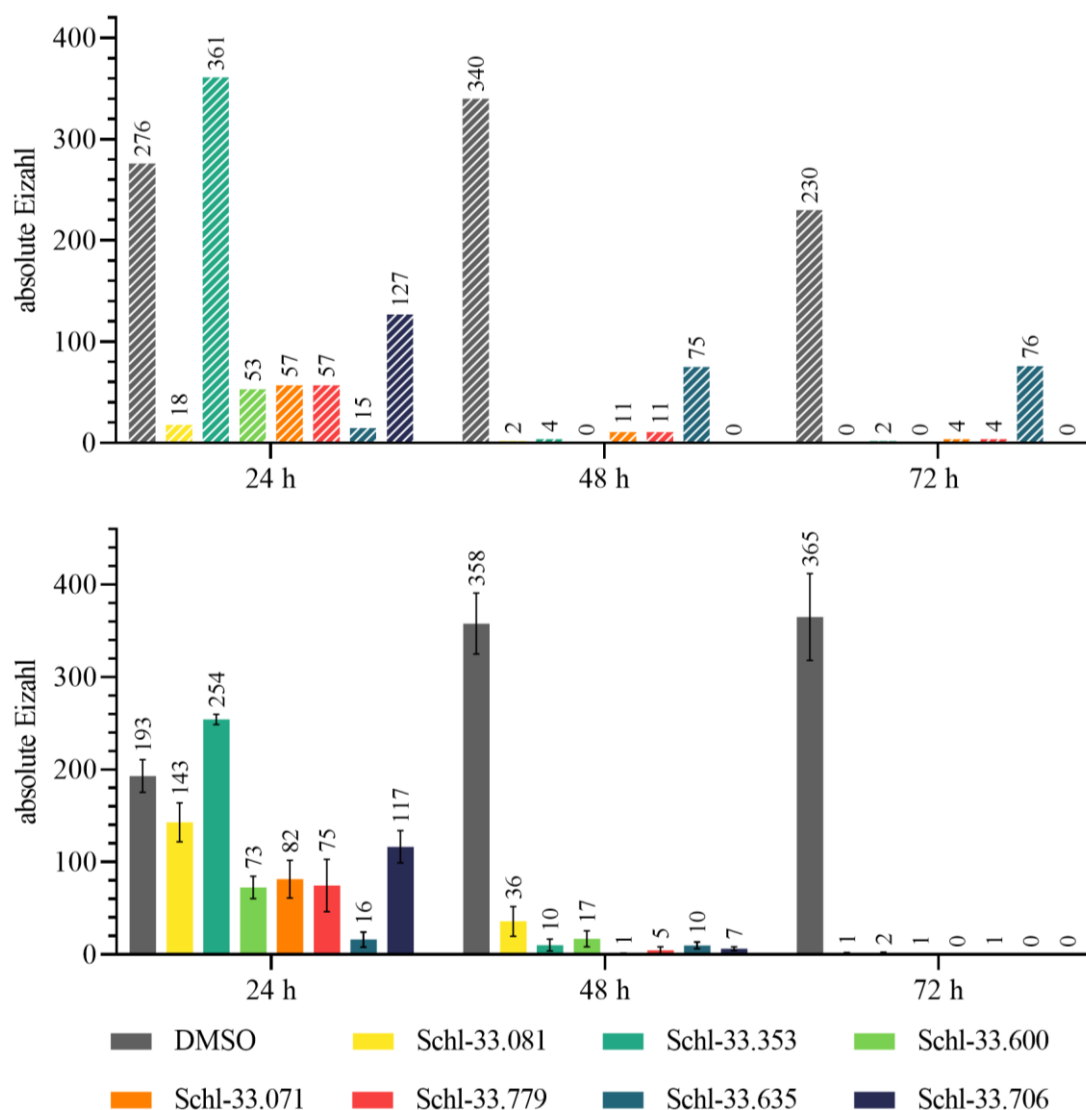
Das Cyclohexylsulfonamid **Schl-33.635** mit 4-(Methylsulfonyl)benzyl-Rest und das 1-(Methylsulfonyl)piperazinamid **Schl-33.706** mit 2-Methoxy-5-chlorbenzyl-Rest zeigten innerhalb der ersten 24 h hinsichtlich der Motilität in beiden Testreihen keine allzu großen Unterschiede (**Abb. 178**). So ging die Motilität jeweils um etwa 20% bzw. 30% zurück. Sobald

die Inhibitoren entfernt waren, nahm die Motilität innerhalb der restlichen Zeit dann nur noch um etwa 10% ab, wobei dies bei **Schl-33.706** bereits innerhalb von 24 h geschah. Wurde der Inhibitor hingegen nicht entfernt, so führte dies bei **Schl-33.635** und **Schl-33.706** zu einem weiteren Rückgang der Motilität von etwa 30% nach 48 h und von weiteren etwa 10% nach 72 h. **Schl-33.706** wirkte dabei schließlich letal. Damit unterscheiden sich jene Verbindungen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in den einzelnen Testreihen unter verschiedenen Versuchsbedingungen um insgesamt etwa 25-35%.

Die Eiproduktion bei dem Dithiocarbamat-Derivat **Schl-33.635** in der Testung, in welcher der Inhibitor entfernt wurde, war mit der anderen Testreihe ohne Inhibitorauswaschung innerhalb der ersten 24 h in etwa vergleichbar (**Abb. 179**). Unterschiede lagen hier bei weniger als 5%. Jedoch führte das Entfernen des Inhibitors dann zu einem Anstieg der Eizahlen von zuvor 5% verglichen mit der DMSO-Kontrolle auf etwa 20% nach 48 h und lag dann schlussendlich sogar bei 30%. Zumindest bezüglich der Eiproduktion kann bei dieser Verbindung das beobachtete Verhalten als reversibler Inhibitoreffekt gedeutet werden.

Alle anderen Derivate, mit Ausnahme von **Schl-33.353**, wichen innerhalb der ersten 24 h in beiden Testungen um etwa 15% (**Schl-33.081** und **Schl-33.706**) bzw. etwa 20% (**Schl-33.600**, **Schl-33.071** und **Schl-33.779**) hinsichtlich der Eiproduktion voneinander ab. Dabei waren die Inhibitoren in der Testreihe mit Auswaschung jeweils aktiver. Die Werte glichen sich allerdings über die Zeit zunehmend an. Nach 48 h war der Unterschied bei **Schl-33.081** mit einer Abweichung hinsichtlich der Reduktion der Eizahl um mehr als 15% noch am größten. Weitere 24 h später waren dann keine allzu großen Abweichungen mehr festzustellen.

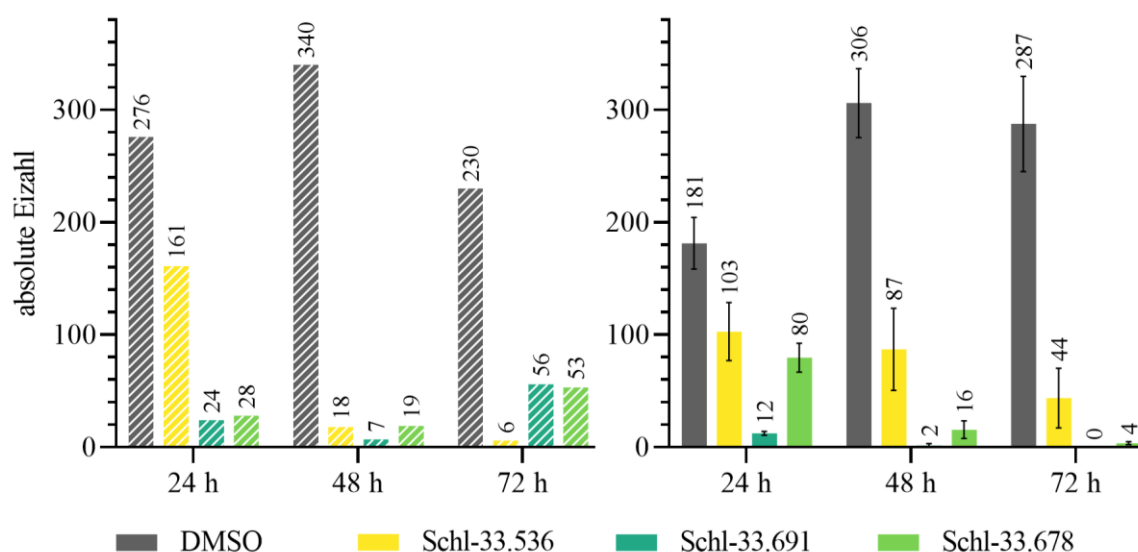
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Wirkung der Inhibitoren weniger stark ausgeprägt ist, sofern diese nach 24 h ausgewaschen werden. Insbesondere die Reduktion der Motilität scheint zu stagnieren, wohingegen die Eiproduktion und auch die Paarungsstabilität, sofern die ersten 24 h für eine signifikante Wirkung ausgereicht haben, auch nach dem Entfernen der Inhibitoren noch weiter beeinflusst werden. Demzufolge scheint es sich eher um nicht reversible Effekte zu handeln, denn auch die Effekte bezüglich Motilität verschwanden für die oben beschriebenen Verbindungen nach Auswaschung der Inhibitoren nicht gänzlich. 24 h reichten jedoch lediglich bei **Schl-33.600**, **Schl-33.071** und **Schl-33.706** zur Ausbildung starker Phänotypen in Form von Darmdilatationen aus. Bei **Schl-33.779** kam es darüber hinaus auch noch zu starken Tegumentschäden.



**Abbildung 179:** Absolute Eizahlen ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden; oben: mit Auswaschung des Inhibitors nach 24 h; unten: fortwährende Inhibitor-Behandlung

Weitere Derivate, die in der Testung der Auswaschung auch noch zu einem inhibitorischen Effekt führten, sind das 2-Thiophensulfonamid **Schl-33.536** mit Cyclohexylmethyl-Rest, das eine Inhibition der Eiproduktion verursachte (**Abb. 180**). Diese wich in ihrer Intensität nach 48 h um etwa 20% und nach 72 h um 15% von den ursprünglichen Testergebnissen ab. Dabei fiel die Inhibition in der Testreihe mit Inhibitorauswaschung deutlich stärker aus. Das Harnstoff-Derivat **Schl-33.691** mit Boc-Piperaziny- und 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest hingegen hatte in beiden Fällen bereits nach 24 h eine etwa 90%-ige Inhibition der Produktion an Eiern zur Folge. Nach 48 h war diese dann annähernd vollständig eingeschränkt. Jedoch stieg die Eiproduktion im Falle des ausgewaschenen Inhibitors innerhalb des letzten Beobachtungszeitraums dann wieder merklich an und lag im Vergleich zu der Eizahl der DMSO-Kontrolle schließlich bei etwa 25%. Mit weniger als 60 Eiern pro 24 h war die Eiproduktion aber immer noch signifikant inhibiert. Auch das Schwefelsäurediamid-Derivat

**Schl-33.678** mit Thiomorpholinyl- und 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl-Rest hatte trotz der Auswaschung des Inhibitors weiterhin einen Einfluss auf die Eiproduktion. Die Inhibition fiel nach 24 h sogar um bis zu 35% stärker als in der ursprünglichen Testung aus, war nach insgesamt 48 h dann aber wieder mit dieser vergleichbar. Auch hier stieg die Anzahl der produzierten Eier innerhalb des Zeitintervalls von 48 h auf 72 h wiederum auf einen Wert, der einer etwa 75%-igen Inhibition entspricht. Eine Reversibilität der Inhibition der Eiproduktion ist für die beiden zuletzt genannten Verbindungen damit im Einzelfall denkbar. Zusätzlich führten **Schl-33.691** wie auch **Schl-33.536** zu schwachen Darmdilatationen. Die Motilität wurde jedoch von keiner der genannten Verbindungen innerhalb der ersten 24 h signifikant beeinflusst. Dies gilt auch für die Zeit nach dem Absetzen des Inhibitors. Auffällig ist eine Zunahme der zuvor zurückgegangenen Motilität von etwa 20% und damit ein Angleichen an die DMSO-Kontrolle bei **Schl-33.691**.

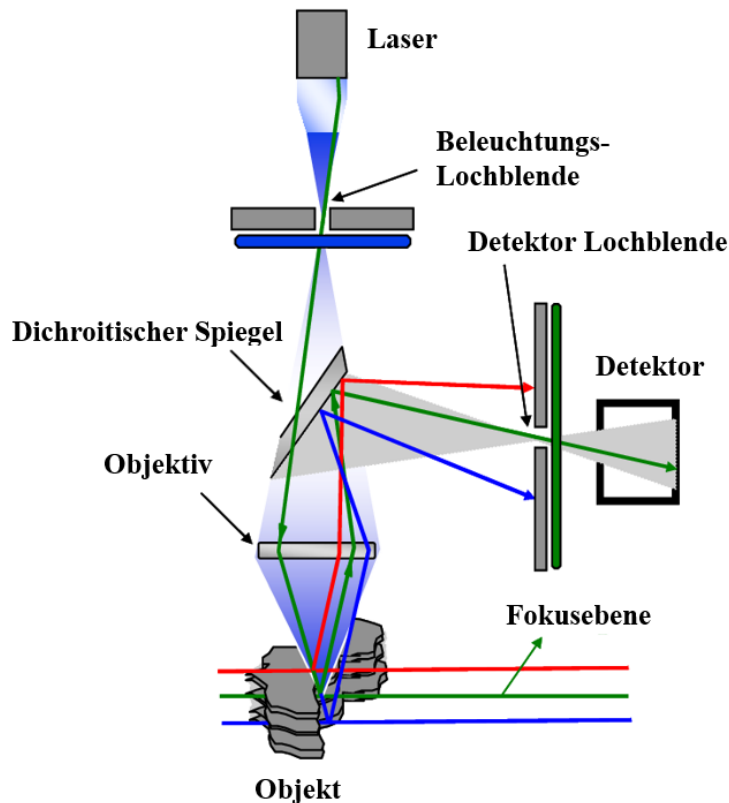


**Abbildung 180:** Absolute Eizahlen ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate bei 10  $\mu\text{M}$  nach 24, 48 und 72 Stunden; links: Auswaschung des Inhibitors nach 24 h; rechts: fortwährende Inhibitor-Behandlung

### 3.11.3 Untersuchung der Schistosomen-Morphologie nach Behandlung mit Dithiocarbamat-Derivaten *via* Konfokal-Mikroskopie

Auch wurde in dieser Arbeit die innere Morphologie der Schistosomen nach Behandlung mit den Dithiocarbamat-Derivaten exemplarisch untersucht, um so aufgetretene Phänotypen genauer zu analysieren. Dazu wurde zunächst eine Färbung der AFA-fixierten (AFA; 2 mL Essigsäure, 3 mL 37%-iger Formaldehyd, 95 mL 70%-iger Ethanol) Schistosomen mit Karminrot vorgenommen. Die Schistosomen wurden dazu 30 min mit LANGERON'S Karminrot-Lösung inkubiert und die Färbung dann mit saurem Ethanol (70%-iger Ethanol, 2,5% konz. HCl) für etwa 10 min ausgewaschen. Dabei wurde die Waschlösung mehrere Male erneuert. Die Schistosomen sollten letztlich schwach rot gefärbt sein. Sodann wurden die Schistosomen für etwa 5 min mit 90%-igem Ethanol und darauffolgend weitere 5 min mit 100%-igem Ethanol versetzt und so dehydratisiert, bevor sie in Kanadabalsam eingedeckelt wurden.<sup>[588]</sup> Der Fluoreszenzfarbstoff konnte dann am konfokalen *Laser-scanning*-Mikroskop (KLSM; Leica TSC SP5 VIS) im Reflektions-Modus mit einem He/Ne-Laser (20% laser power, 12% PMT, line average 4) bei 488 nm (blau/grün) angeregt werden. Detektiert wurde dabei das emittierte Fluoreszenzlicht, das infolge der Aufteilung der abgegebenen Energie in Wärme und Licht, eine um bis zu 50 nm größere Wellenlänge (grün/gelb) als das Anregungslicht besitzt und damit energieärmer ist (*Stokes*-Verschiebung). Die Lochblende wurde zur Optimierung der Signalstärke auf 1 AU eingestellt. Beleuchtung und Hintergrund wurden je nach Objekt gewählt. Jedes Objekt wurde unter Verwendung von Öl mikroskopiert.

Während bei einem konventionellen Lichtmikroskop das gesamte Präparat von einem Lichtstrahl in Gänze beleuchtet wird, erfolgt dieses bei der *Laser-Scanning*-Konfokalmikroskopie (CLSM) zu jedem Zeitpunkt nur von einem Lichtpunkt. Die Beleuchtung des Präparates erfolgt also Stück für Stück. Die Intensität des durch Fluoreszenz abgegebenen Lichtes wird abschließend dann zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt. Da Konfokal-Mikroskope vor dem Detektor zudem eine zusätzliche Lochblende besitzen, das sogenannte *pinhole*, kann nur das Licht aus der Fokusebene den Detektor erreichen (**Abb.181**). Streulicht wird dadurch massiv reduziert, wodurch eine sehr gute Auflösung erreicht und optische Schnitte möglich werden.<sup>[589]</sup>



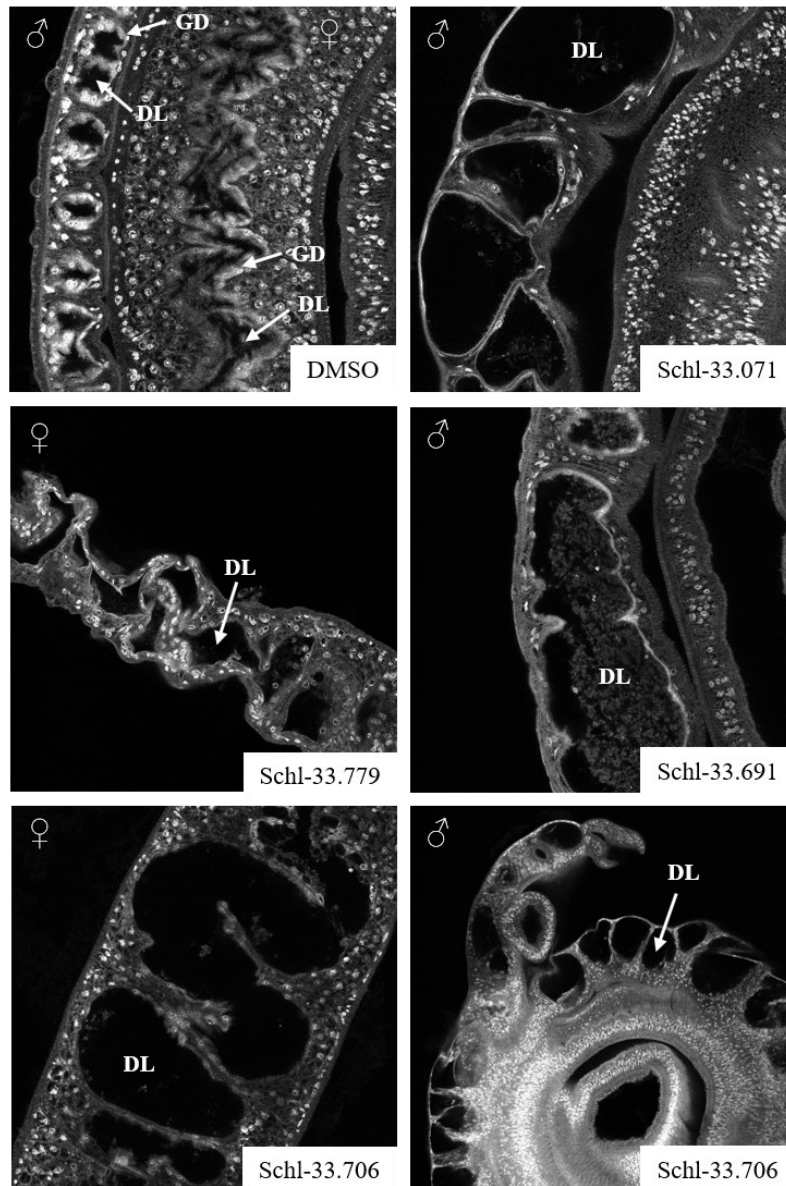
**Abbildung 181:** Grundprinzip der *Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie* (grüner Lichtstrahl: Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene; roter und blauer Lichtstrahl: *out of focus*- Licht; überarbeitet nach DEWETTINCK *et al.*)<sup>[590]</sup>

Nachfolgend werden nun die einzelnen Beobachtungen kurz beschrieben. Die Bewertung und Interpretation der konfokalmikroskopischen Aufnahmen stützte sich dabei auf Arbeiten von S. BECKMANN, A. S. BLOHM und J. KELLERSOHN *et al.*<sup>[261,263,591,592]</sup>

Als primär beobachteter Phänotyp aller aktiven Dithiocarbamat-Derivate zeigte sich eine massive Schädigung des Darmtraktes der Schistosomen. Davon waren sowohl das männliche als auch das weibliche Geschlecht betroffen. Das Darmlumen, also der Raum innerhalb der Darmschlingen, der normalerweise mit Speisebrei oder Stuhl gefüllt ist, ist gegenüber der DMSO-Kontrolle bedeutend verändert (angeschwollen) und lässt in einigen Fällen jegliche Struktur vermissen. Auch die Gastrodermis, welche normalerweise die gesamte Verdauungshöhle in Form einer dicken, durchgehenden Schicht auskleidet (syncytiales Epithel) und vom Parenchym-Gewebe flankiert wird, war stark angegriffen (zumeist vollständig abgelöst). Fragmente der Gastrodermis finden sich mitunter im verbliebenen Teil des Darms wieder (**Abb. 182**). Eine veränderte Morphologie des Lumens oder der Gastrodermis kann auf eine Schädigung von Zellen und Gewebe hindeuten. Die intestinale Barrierefunktion ist damit gestört. Zudem könnten Darm-assoziierte Enzyme in ihrer Expression oder Funktion beeinträchtigt sein. Ein intakter Darmtrakt inklusive einer funktionsfähigen Gastrodermis ist für das Überleben der Schistosomen aber von entscheidender Bedeutung.

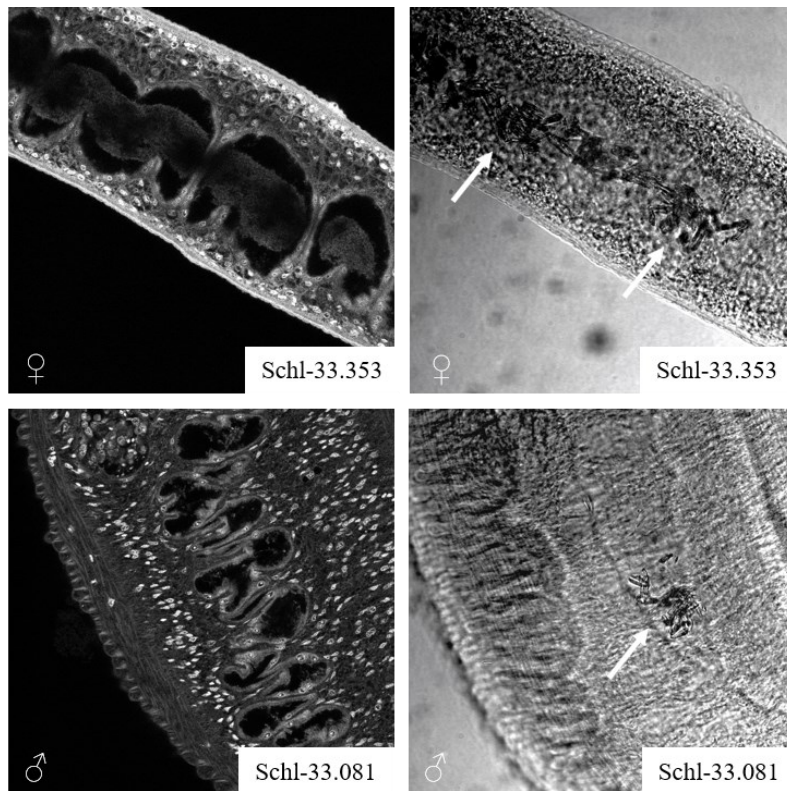


So besitzt das Cytoplasma der Gastrodermis eine Vielzahl von Mitochondrien, Kernen, eine Biosynthese-Maschinerie (mit aktivem Golgi-Apparat), ein endoplasmatisches Reticulum sowie zahlreiche Vesikel.<sup>[593–595]</sup> Auch wird die Oberfläche des Darm-Syncytiums durch feine, cytoplasmatische Lamellen vergrößert, welche die Absorption von Nährstoffen über *Carrier*-Proteine ermöglichen.<sup>[596,597]</sup> Die Hauptaufgabe des Darmtraktes der Schistosomen besteht darin, Makromoleküle (Serum-Proteine und lysierte Erythrozyten) aus dem Blut des Wirts zu verdauen und in lösliche Produkte (Aminosäuren) zu überführen, die dann absorbiert werden können und damit das Überleben im Wirt sichern. An der Verdauung und damit der Freisetzung von Nährstoffen sind verschiedene Peptidasen beteiligt, die vorwiegend im Darmlumen lokalisiert sind. Dazu zählt unter anderem Cathepsin-B1 (eine Papain-artige Cystein-Peptidase), Protein Sm32 (eine Asparaginy-Peptidase) und Cathepsin D (eine Aspartat-Peptidase).<sup>[598–600]</sup> Andere Darm-Proteine, die in der Gastrodermis existieren, sind z.B. die Superoxid-Dismutase, Syntenin und Saposin. Bei der Superoxid-Dismutase handelt es sich um ein Enzym, dass an der antioxidativen Abwehr beteiligt ist.<sup>[601]</sup> Syntenin ist vermutlich in Funktionen wie den zellulären Transport und die Biogenese von kleinen extrazellulären Vesikeln eingebunden, wohingegen Saposin Sphingolipide bindet und damit deren Verdau durch Ceramidasen ermöglicht.<sup>[602]</sup> Auch andere Lipide werden von Saposin gebunden und können somit letztlich in die Zellen aufgenommen werden.<sup>[603]</sup>



**Abbildung 182:** Darmdilatationen an Schistosomen-Männchen und -Weibchen nach Inkubation mit Dithiocarbamat-Derivaten bei 10  $\mu\text{M}$  (DMSO-Kontrolle: abgegrenztes Darmlumen (DL) und intakte Gastrodermis (GD); **Schl-33.071/779/691/706:** vergrößertes Darmlumen mit ungeordneter Struktur, Gastrodermis vollständig abgelöst und nur noch in Fragmenten im Darm enthalten)

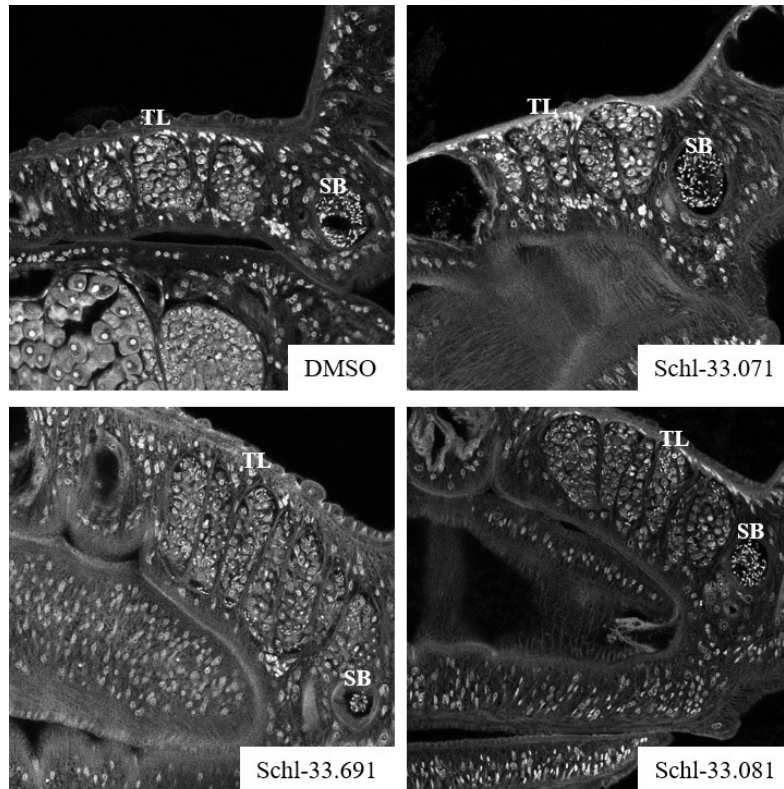
Auffällig bei der Betrachtung des Darmtraktes war zudem, dass in einigen Fällen „Fremdkörper“ im Bereich des Darmlumens gefunden wurden, die sich bei genauerer Betrachtung im *bright-field*-Modus als kristallartige Gebilde herausstellten (**Abb. 183**). Möglicherweise handelt es sich hierbei um ausgefallene Substanz. Dies lässt vermuten, dass die Dithiocarbamat-Derivate den Darm bzw. dort vorhandene Enzyme als Target adressieren. Ein möglicher Wirkmechanismus könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die Substanzen ausfielen/aggregierten.



**Abbildung 183:** Kristallartige Gebilde im Darmlumen (links: Bild des Darmlumens von Schistosomen-Männchen und -Weibchen nach Inkubation mit den Dithiocarbamat-Derivaten bei 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h im CLS; rechts: selber Bildausschnitt im *bright-field*-Modus; kristallartige Gebilde sind mit einem Pfeil markiert)

Auch die Reproduktionsorgane (Gonaden) der nach Behandlung mit den Dithiocarbamat-Derivaten entpaarten Männchen wurden genauer betrachtet, was damit zu begründen ist, dass die Dithiocarbamat-Derivate auch die Eiproduktion entscheidend hemmten. Insgesamt waren die männlichen Reproduktionsorgane aber kaum von einer Wirkung betroffen. Wie der DMSO-Kontrolle in **Abbildung 184** zu entnehmen ist, sind die Testes (Hoden) maturer *S. mansoni*-Männchen aus mehreren Loben aufgebaut. Gefüllt sind diese mit Keimzellen (Spermatogonien, Spermatocyten), die sich in verschiedene Differenzierungsstadien unterteilen lassen. Im Bereich der Testesloben, der dem gynaeophoren Kanal zugewandt ist, lassen sich einzelne Spermien erkennen, die sich aus elongierten Spermatozoen entwickelt haben. Ferner ist die Samenblase sichtbar (diese steht über einen Samenleiter mit den Testesloben in Kontakt und mündet über einen weiteren Samenleiter in den gynäcophoren Kanal), die mit einer Vielzahl von Spermien gefüllt ist (vgl. NEVES *et al*).<sup>[604]</sup>

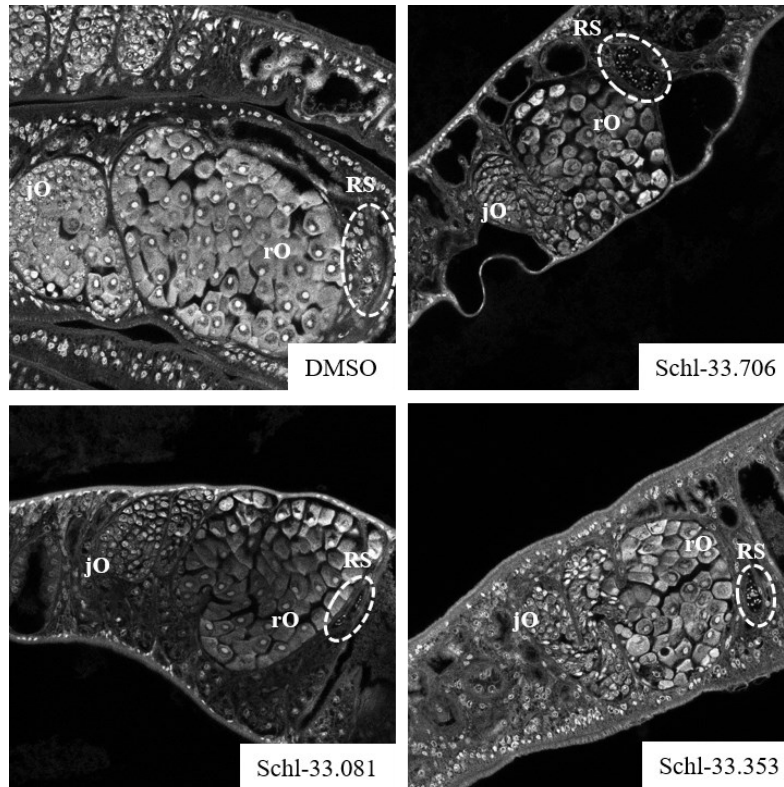
Auch bei den über 72 h behandelten Schistosomen-Männchen, waren im ventralen Bereich der Testes zumeist Spermien zu finden. Dies trifft ebenso auf die Samenblase zu, die weiterhin mit einer Vielzahl von Spermien gefüllt war. Die Testesloben waren in ihrer Größe unverändert und mit Spermatocyten gefüllt.



**Abbildung 184:** Gonaden von Schistosomen-Männchen nach Inkubation mit Dithiocarbamat-Derivaten bei 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h (DMSO-Kontrolle: abgegrenzte Testeslumen (TL) und mit Spermien gefüllte Samenblase (SB); **Schl-33.071/691/081**: unveränderte Morphologie)

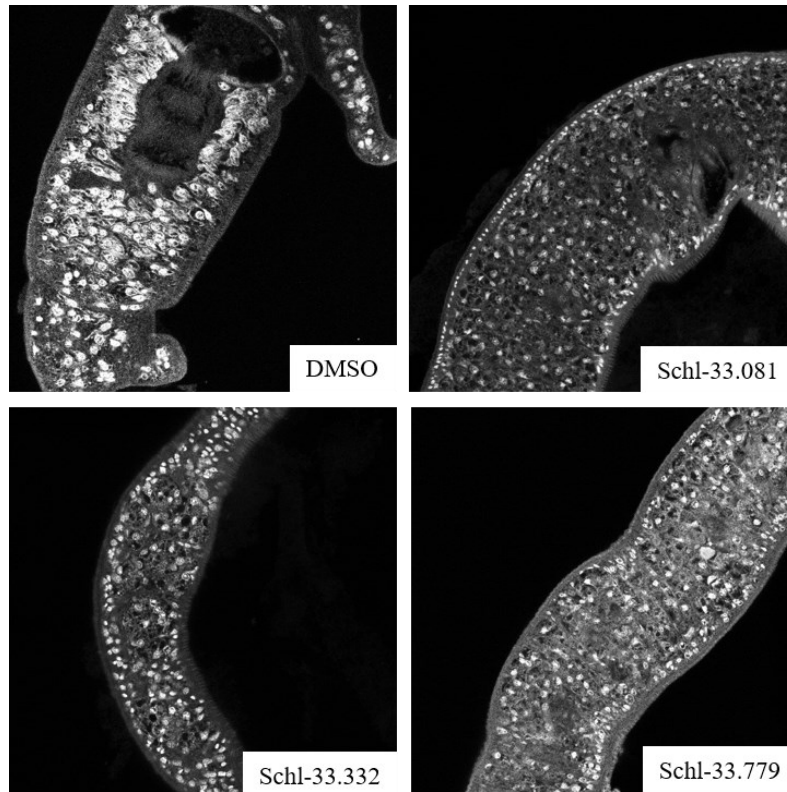
An den Reproduktionsorganen der Weibchen konnten nach Behandlung mit den Dithiocarbamaten ebenfalls kaum Veränderungen wahrgenommen werden. Das Ovar (Eierstock) von maturen *S. mansoni*-Weibchen lässt sich, wie bei der DMSO-Kontrolle in **Abbildung 185** zu sehen ist, in drei Bereiche einteilen. Im Ersten befinden sich kleine, unreife Oozyten (Oogonien). Diese haben Stammzellcharakter. Der mittlere Bereich beinhaltet reifende Oozyten, die an Volumen zunehmen, wohingegen sich im letzten Teil des Ovars große, reife Oozyten befinden. Diese besitzen einen großen dunklen Nukleus und einen kleinen leuchtenden Nukleolus. Neben dem Ovar befindet sich das *Receptaculum seminis*, eine Art Vorratstasche, die mit männlichem Sperma gefüllt ist. Das Ovar mündet weiterhin, was hier jedoch nicht allzu deutlich zu erkennen ist, in den Ovidukt, wo die eigentliche Befruchtung der reifen Oozyte erfolgt. Im Ootyp entsteht aus der befruchteten Oozyte und mehreren Vitellozyten dann schließlich ein Ei, das in den Uterus abgegeben wird.<sup>[604]</sup>

Das *Receptaculum seminis* war auch noch nach 72 h Inkubation mit den Dithiocarbamaten mit Spermien gefüllt. Die drei genannten Bereiche des Ovars waren weiterhin deutlich voneinander abgegrenzt und zeigten den für unbehandelte Weibchen typischen Aufbau mit unreifen und reifen Oozyten.



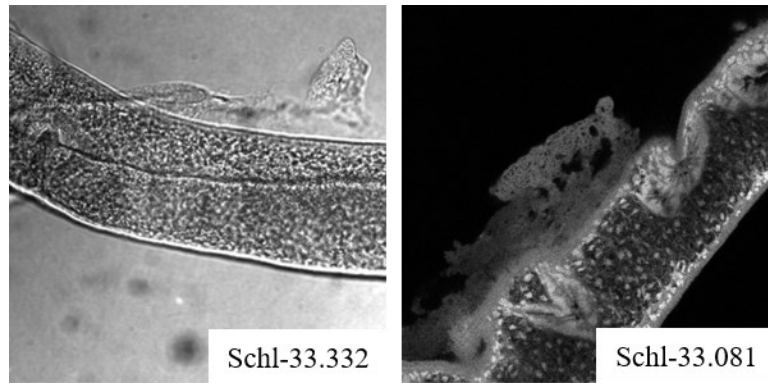
**Abbildung 185:** Gonaden von Schistosomen-Weibchen nach Inkubation mit Dithiocarbamat-Derivaten bei 10  $\mu$ M nach 72 h (DMSO-Kontrolle: strukturiertes Ovar mit jungen Oozyten (jO) und reifen Oozyten (rO) sowie mit Spermien gefülltes *Receptaculum seminis* (RS); Schl-33.706/081/353: unveränderte Morphologie)

Auch das Vitellarium (Dotterstock) als das größte Organ von Schistosomen-Weibchen, das etwa zwei Drittel des Körpers einnimmt, wurde untersucht. Dieses Gewebe besteht aus einem Netzwerk von Loben mit Stammzellen, die sich teilen und so letztlich zu Vitellinzellen werden, die zusammen mit den Oozyten Bestandteil der Eier sind.<sup>[605]</sup> Gegenüber den Kontroll-Weibchen wies das Vitellarium erkennbare Unterschiede in der Morphologie auf und scheint damit durch die Dithiocarbamat-Derivate beeinflusst zu werden (Abb. 186). So ist seine Struktur von löchrigem Aussehen (*swiss chesse like tissue*). Die Vitellinzellen waren weniger geordnet und erschienen teilweise apoptotisch.



**Abbildung 186:** Vitellarium von Schistosomen-Weibchen nach Inkubation mit Dithiocarbamat-Derivaten bei 10  $\mu$ M nach 72 h (DMSO-Kontrolle: intakt; **Schl-33.081/332/779**: löchrige Anordnung der Vitellinzellen)

Als sekundärer Phänotyp der aktiven Dithiocarbamat-Derivate wurde das Auftreten von Tegumentschäden unter anderem in Form von Tegumentablösungen beobachtet (**Abb. 187**), die infolge der zahlreichen Aufgaben, welche diesem zugesprochen werden, gravierende Folgen haben.<sup>[606]</sup> So wird dem Tegument als äußere Oberfläche der Schistosomen eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Abwehr der Immunantwort des Wirtes zuteil, an der vermutlich ein LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein receptor*) entscheidend beteiligt ist. Es wird angenommen, dass die Schistosomen durch die Bindung von humanem LDL gegenüber den Wirtsantikörpern abgeschirmt werden.<sup>[607]</sup> Als weitere Mechanismen, um der Immunantwort des Wirts zu entkommen, sind die proteolytische Zersetzung von Proteinen der Wirtsabwehr oder die ständige Erneuerung des Teguments zu nennen.<sup>[608]</sup> Das Tegument besteht aus einer Doppelmembran. Seine Oberfläche ist von zahlreichen Falten/Gruben durchzogen und mit Tuberkeln besetzt. Es besitzt eine hohe metabolische Aktivität und enthält zahlreiche Transportproteine zur Aufnahme von Nährstoffen, wie zum Beispiel Zuckern, Aminosäuren und anorganischer Salze, aber auch Phospholipiden und Cholesterol.<sup>[609–611]</sup> Außerdem ist es an der Regulation des osmotischen Drucks beteiligt.<sup>[612]</sup> Als Grenzfläche der Interaktion zwischen Männchen und Weibchen findet über das Tegument auch die Kommunikation beider Geschlechter statt.<sup>[613]</sup>



**Abbildung 187:** Tegumentschäden in Form von Tegumentablösung nach Inkubation mit **Schl-33.332** und **Schl-33.081** bei 10  $\mu\text{M}$  nach 72 h

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung der Schistosomen mit den Dithiocarbamat-Derivaten vor allem die Gastrodermis und das Vitellarium schädigte, es aber auch vereinzelt zu Tegumentschäden kam. Weitere Veränderungen wurden nicht beobachtet.

### 3.11.4 *In-vitro*-Testung an Schistosomula (Somules)

Die gegenüber adulten *S. mansoni* wirksamen und nicht zytotoxischen Verbindungen wurden allesamt auch noch gegenüber dem juvenilen Stadium getestet. Eine Aktivität gegenüber dem juvenilen Stadium ist wünschenswert, weil der „Goldstandard“ Praziquantel gegenüber diesem Stadium nicht aktiv ist. Zuversichtlich stimmte die bis zu einer Konzentration von 0,5-1,0  $\mu\text{M}$  anhaltende Wirkung von Disulfiram und früherer Dithiocarbamat-Derivate wie **Schl-32.028** (Tab. 51, S. 328), die neben letalen Effekten auch das Auftreten von Tegumentschäden beinhaltet (unveröffentlichte Daten AG GREVELDING). Da alle dargestellten Dithiocarbamate von Disulfiram abgeleitet sind, wurde auch hier eine antischistosomale Wirkung gegenüber den Schistosomula angenommen.

Die Testungen erfolgten dabei ebenfalls in Kooperation mit dem Arbeitskreis GREVELDING der JUSTUS-LIEBIG-Universität in Gießen und wurden eigenständig nach intensiver Einführung durch S. HÄBERLEIN durchgeführt. Für die Testungen wurden die Schistosomula durch Transformation aus Zerkarien erhalten. Die Zerkarien wiederum wurden aus zuvor mit Miracidien infizierten Süßwasserschnecken des Typs *Biomphalaria* spp. gewonnen. Um die Zerkarien freizusetzen, wurden die Schnecken in einer 24-well-Platte in einem Volumen von etwa 2 mL „Schneckenwasser“ [für 1 L: 3 mL Lösung I (11 g  $\text{CaCl}_2$ ; 7 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; dest.  $\text{H}_2\text{O}$  ad 200 mL); 2 mL Lösung II (0,6 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; 4,6 g  $\text{NaHCO}_3$ ; dest.  $\text{H}_2\text{O}$  ad 200 mL); 0,4 mL Lösung III (0,6 M  $\text{NaOH}$ )] für 1 Stunde mit einer Lichtplatte bestrahlt. Zur Reinigung der erhaltenen Zerkarien wurden diese mit einer Pipette in ein 50 mL Falconröhrchen überführt und durch Sedimentation von etwaigen Verunreinigungen wie etwa Schnecken-Faeces abgetrennt. Das Falconröhrchen wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt, damit sich die Zerkarien am Boden absetzten und der Überstand abgenommen werden konnte. Die somit aufkonzentrierten Zerkarien wurden in eine 10 mL Spritze überführt, die über eine Doppelendnadel (22 gauge) mit einer weiteren Spritze verbunden wurde. Durch Ziehen und Drücken der Stempel wurden die Zerkarien etwa 40 Mal von einer in die andere Spritzenkammer transferiert und damit mechanisch transformiert. Durch den geschilderten Ablauf wurde der Durchtritt durch die Haut simuliert, und die Zerkarien verloren ihren Schwanz. Die Schistosomula wurden in ein 15 mL Falconröhrchen überführt, das wiederum für etwa 7 Minuten auf Eis gestellt wurde, woraufhin sich die Schistosomula absetzten. Die weiterhin oben aufschwimmenden Zerkarien und abgetrennten Schwänze wurden entfernt, und die Zerkarienköpfe mit *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Hierzu wurde das Sediment jeweils mit etwa 7 mL HBSS versetzt. Abschließend wurde die HBSS-Lösung weitestgehend entfernt, und die Schistosomula wurden

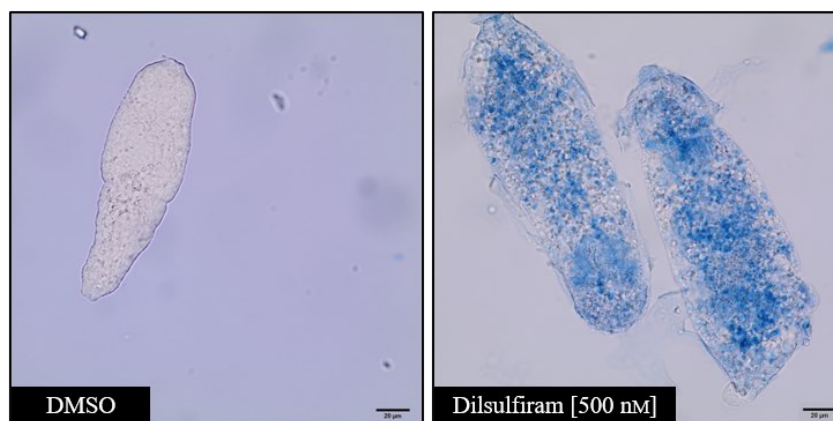


in etwa 5 mL warmem M199-Medium, welches mit 10% NCS und 1% ABAM (10.000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 mg Amphotericin B pro mL) aber nicht HEPES versetzt war, aufgenommen. Die resultierende Lösung wurde in eine hochwandige Petrischale dekantiert. Mit kreisenden Bewegungen wurden die Schistosomula in der Mitte des Gefäßes zentriert und dann in ein 2 mL Eppendorftube überführt. Um die Anzahl der in Lösung enthaltenen Schistosomula zu bestimmen, wurden 3 x je 20 µL an Medium entnommen und die darin enthaltenen Schistosomula gezählt. Die Anzahl sollte je Aliquot > 15 sein. Ansonsten musste die Lösung nochmals aufkonzentriert werden. Alle verwendeten Pipetten und Gefäße wurden aufgrund der Infektionsgefahr durch die Zerkarien mit Ethanol gründlich desinfiziert. Um ein Anhaften der Schistosomula unter anderem in den Pipettenspitzen zu verhindern, wurden alle für diese verwendeten Geräte zuvor mit Hühner-Serum behandelt. Die frisch erhaltenen Schistosomula wurden direkt umgesetzt und für die Testung der Inhibitoren verwendet.

Alle zu testenden Verbindungen wurden als Duplikat angesetzt. Ausgehend von einer 10 mM Stammlösung wurde dazu eine Vorverdünnung in einer fünffach so hohen Konzentration wie der Endkonzentration in 1,1 mL M199-Nährmedium hergestellt. Davon wurden 50 µL auf 150 µL Nährmedium in einer 96-well-Platte gegeben. Es folgten 50 µL der Schistosomula-Suspension. Pro well befanden sich letztlich etwa 50 Schistosomula, die mit Inhibitor-Konzentrationen von 5 µM und 1 µM über einen Zeitraum von 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> behandelt wurden. Die Endkonzentrationen orientierten sich dabei auch an zuvor durchgeführten Löslichkeitstestungen in dem verwendeten Medium. In einem Negativ-Kontrollversuch wurde eine Lösung aus Dimethylsulfoxid eingesetzt, als Positivkontrolle diente Disulfiram. Alle 24 Stunden wurden 150 µL des Mediums entfernt und durch 150 µL M199-Nährmedium, welches den Inhibitor in einfacher Konzentration enthielt, ersetzt.

Die Bewertung der Substanzwirkung erfolgte wie auch bei den adulten Schistosomen alle 24 Stunden unter dem Lichtmikroskop. Neben der Beweglichkeit, die vermindert sein konnte, wurde auch auf ruckartige Bewegungen oder den Verlust von Plastizität geachtet. Weiterhin wurden die Morphologie und die Integrität des Teguments untersucht. Geschädigte Schistosomula können demnach von der normalen Gestalt etwa durch das Schrumpfen oder Anschwellen abweichen. Ferner können Tegumentblasen oder eine dunkel gefärbte Pigmentierung auftreten. Mit Hilfe eines *Scoring*-System nach KEISER *et al.*, wonach die Gesamtheit aller Schistosomula in einem well bepunktet wurde, wurden etwaige Veränderungen bewertet.<sup>[614]</sup> Dabei gilt: 3 = Phänotypen und Motilität wie im Negativ-Kontrollversuch, 2 = einige Schistosomula mit reduzierter Motilität und deformiert, 1 = die

meisten Schistosomula mit schwer reduzierter/nicht sichtbarer Motilität und deformiert, 0 = alle Schistosomula tot (sofern nach 20 Sekunden Beobachtungsdauer keinerlei Bewegung). Da ein Abkühlen des Mediums eine verminderte Beweglichkeit induziert und somit Einfluss auf die Bewertung nimmt, wurde darauf geachtet, dass die verwendete 96-well-Platte nicht länger als 15 Minuten außerhalb des Inkubators belassen wurde. Eine bessere Unterscheidung von lebenden und toten Schistosomula ist durch das finale Anfärben mit *Trypan*-Blau möglich. Während sich tote Schistosomula blau färben, bleiben lebende Schistosomula zunächst (für 5-10 Minuten) ungefärbt (**Abb. 188**). 10 µL Schistosomula-Lösung werden hierzu mit 10 µL *Trypan*-Blau versetzt.



**Abbildung 188:** Ungefärbte, lebende Schistosomula der DMSO-Kontrolle und mit *Trypan*-Blau angefärbte, tote Schistosomula nach Behandlung mit Disulfiram

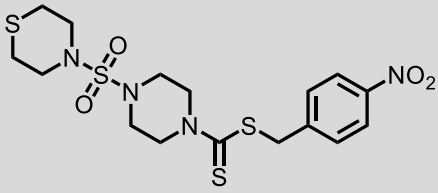
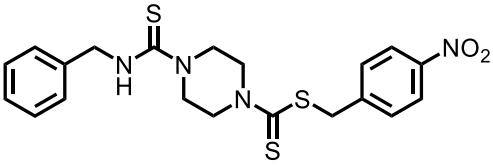
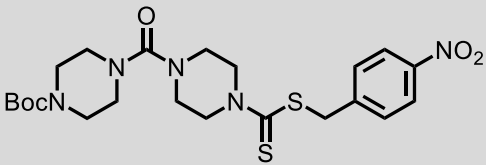
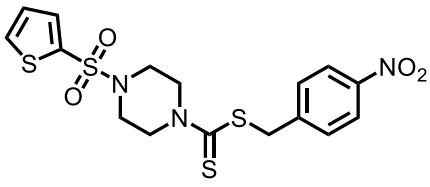
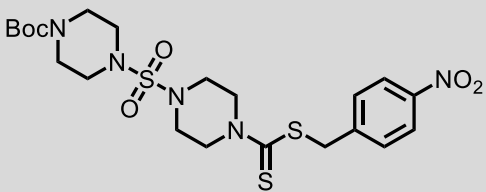
Insgesamt verlief die Testung der dargestellten Verbindungen unerwartet. Massive Effekte traten für keine der Verbindungen auf. Lediglich die Motilität ging über 72 Stunden vereinzelt leicht zurück. Ein *Score* unterhalb von 2 wurde nicht vergeben. Die getesteten Dithiocarbamat-Derivate waren damit, wenn überhaupt, nur schwach aktiv. In **Tabelle IV** (S. 573) im Anhang sind die getesteten Verbindungen samt der eingesetzten Konzentration sowie der jeweils vergebene *Score* aufgeführt. Dabei ist auch festzustellen, dass Schistosomula in der DMSO-Kontrolle (nur Lösungsmittel) über 72 Stunden deutlich an Motilität verloren. Aus diesem Grund sollte die *in-vitro*-Testung hinsichtlich des Mediums und weiterer Parameter optimiert werden und die Testung wiederholt werden.

### 3.11.5 *In-vitro*-Testung an adulten Schistosomen der Art *S. japonicum*

Außer an adulten Schistosomen der Art *S. mansoni* wurden Testungen ausgewählter Verbindungen auch an adulten Schistosomen der Art *S. japonicum* durchgeführt und damit einer weiteren der drei wichtigsten humanpathogenen Spezies, die für die meisten Erkrankungen der Schistosomiasis weltweit verantwortlich sind. Die Testung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. MIN HU (Wuhan, China). Dabei zeigte sich, dass die Dithiocarbamat-Derivate (wie auch Praziquantel) auch gegen *S. japonicum* aktiv sind. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu Oxamniquin dar, dass nur gegen *S. mansoni* wirkt. Obwohl Würmer von *S. japonicum* größer als Würmer von *S. mansoni* sind, beeinträchtigten die getesteten Verbindungen in ähnlicher Weise Vitalität, Motilität und Eiproduktion beider Wurm-Arten. Die wesentlichen Beobachtungen sind in **Tabelle 49** aufgeführt.

Demnach führten alle fünf Derivate bei einer Konzentration von 10 µM an *S. japonicum* zu einer Entpaarung von etwa 30% wie bei **Schl-33.290** und **Schl-33.331** oder etwa 60% wie bei **Schl-33.082**. Unterhalb von 10 µM wurden keine signifikanten Änderungen beobachtet. Die Motilität beeinflusste **Schl-33.290** mit einer etwa 60%-igen Reduktion bei 10 µM am wenigsten. **Schl-33.250** und **Schl-33.332** zeigten bei 10 µM auch vereinzelt letale Effekte. Die Letalität beschränkte sich bei **Schl-33.332** auf das weibliche Geschlecht. Mit Ausnahme von **Schl-33.290** nahmen alle Derivate selbst bei 5 µM noch Einfluss auf die Motilität. Die Wirkung lag bei einem Rückgang von etwa 30% **Schl-33.082** bis zu etwa 50% bei **Schl-33.331** und **Schl-33.332**. Zusätzlich wirkten alle Derivate auf die Eiproduktion. Dabei zeigte **Schl-33.290** mit einem Rückgang der Eizahlen um 72 h gegenüber der DMSO-Kontrolle den schwächsten Effekt. **Schl-33.250** und **Schl-33.331** wirkten mit einer 98%-igen Inhibition bei 10 µM am stärksten. Vermehrt traten auch deformierte Eier auf. Außerdem kam es zu Tegumentschäden in Form von Tegumentblasen und Ablösungen des Teguments sowie zu Darmdilatationen. Am stärksten ausgeprägt waren die Tegumentschäden bei **Schl-33.082** und **Schl-33.332**. Die Darmdilatationen betrafen nur bei **Schl-33.082** ausschließlich die Weibchen, alle anderen Derivate führten hingegen zu Schäden bei beiden Geschlechtern.

**Tabelle 49:** Strukturformeln und Vergleich der Beobachtungen bei der *in-vitro*-Testung an *S. japonicum* und *S. mansoni* nach 72 h (die Beobachtungen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf Konzentrationen von 10  $\mu$ M)

Strukturformel	<i>S. japonicum</i>	<i>S. mansoni</i>	Kriterium
 <p><b>Schl-33.290</b></p>	60%	61%	Reduktion d. Motilität
	30%	100%	Entpaarung
	♂+♀	stark (♂+♀)	Darmdilatation
	72%	~ 100%	Reduktion d. Eizahl
	vorhanden	vorhanden	Tegumentschäden
 <p><b>Schl-33.250</b></p>	35% (5 $\mu$ M)	23% (5 $\mu$ M)	Reduktion d. Motilität
	35%	100%	Entpaarung
	10%	8%	Letalität
	♂+♀	stark (♂+♀)	Darmdilatation
	98%	~ 100%	Reduktion d. Eizahl
	Blasen	vorhanden	Tegumentschäden
 <p><b>Schl-33.331</b></p>	65% 50% (5 $\mu$ M)	68% 59% (5 $\mu$ M)	Reduktion d. Motilität
	30%	100%	Entpaarung
	♂+♀	stark (♂+♀)	Darmdilatation
	98%	100%	Reduktion d. Eizahl
	vorhanden	stark	Tegumentschäden
 <p><b>Schl-33.082</b></p>	65% 30% (5 $\mu$ M)	67% 55% (5 $\mu$ M)	Reduktion d. Motilität
	60%	100%	Entpaarung
	♀	sehr stark (♀)	Darmdilatation
	84%	~ 100%	Reduktion d. Eizahl
	stark	vorhanden	Tegumentschäden
 <p><b>Schl-33.332</b></p>	31% 50% (5 $\mu$ M)	64% 36% (5 $\mu$ M)	Reduktion d. Motilität
	40%	90%	Entpaarung
	20% (♀)	0%	Letalität
	♂+♀	♀	Darmdilatation
	95%	~ 100%	Reduktion d. Eizahl
	Ablösung	vorhanden	Tegumentschäden

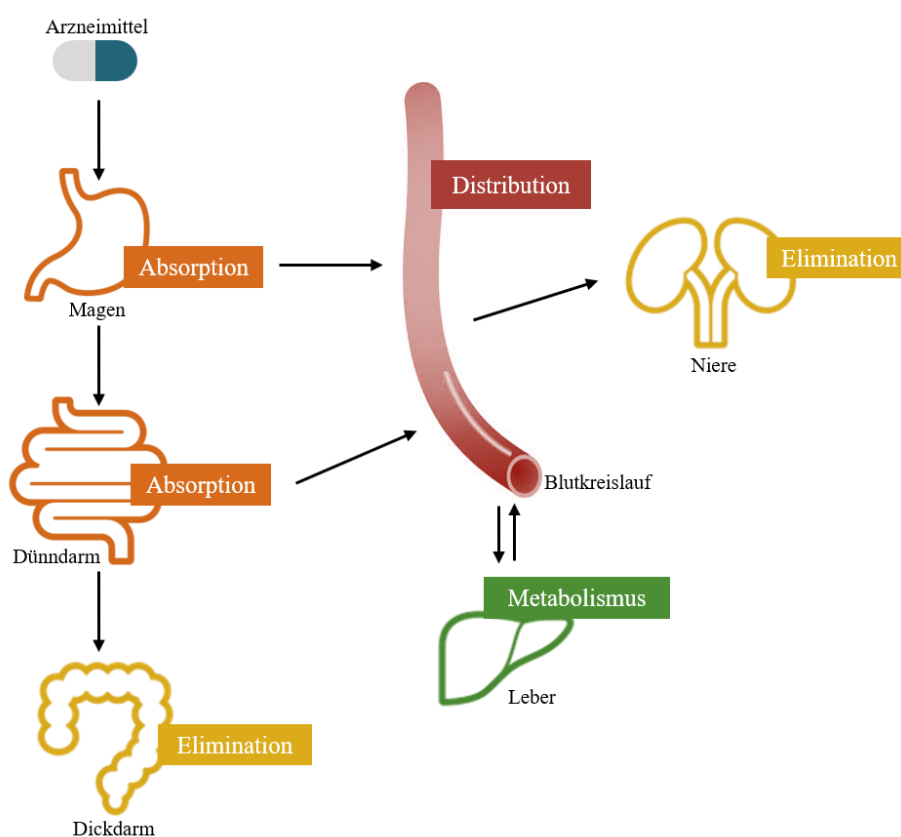
Vergleicht man die Testergebnisse an *S. japonicum* mit denen an *S. mansoni*, so fällt auf, dass sich diese insbesondere hinsichtlich des Auftretens von Entpaarungen unterscheiden. So liegen hier Abweichung zwischen 40% (**Schl-33.082**) und 70% (**Schl-33.290/331**) vor. Etwas größere Abweichungen von 28% bzw. 16% bei der Reduktion der Eizahl weisen auch die Ergebnisse der Behandlung mit **Schl-33.290** oder **Schl-33.082** auf. Die Reduktion der Motilität wiederum unterscheidet sich bei **Schl-33.250** mit 12% und bei **Schl-33.082** mit 25% bei 5 µM am deutlichsten. In allen Fällen wird *S. mansoni* dabei stärker beeinflusst. Lediglich durch **Schl-33.332** wird die Motilität von *S. japonicum* gegenüber der von *S. mansoni* mit einer Reduktion von 50% gegenüber 36% bei 5 µM bzw. 20% Letalität gegenüber 0% bei 10 µM etwas stärker reduziert. Darmdilatationen und Tegumentschäden an *S. mansoni* sind mitunter etwas deutlicher ausgeprägt, wobei es auch hier Ausnahmen wie bei der Intensität der durch **Schl-33.082** oder **Schl-33.332** verursachten Tegumentschäden an *S. japonicum* gibt, die gegenüber denen von *S. mansoni* stärker sind.

### 3.12 In-Silico-Vorhersagen

#### 3.12.1 ADME-Tox-Prediction

Für alle *in vitro* aktiven Dithiocarbamate, die bis 100  $\mu\text{M}$  nicht zytotoxisch gegenüber der HepG-2-Zelllinie waren, wurde abschließend auch eine computergestützte Berechnung der ADME-Tox-Parameter vorgenommen, um somit eine weiterführende Priorisierung und letztlich Profilierung zu erleichtern. Hierzu wurden die frei zugänglichen Programme *DataWarrior* und *SwissADME* verwendet.<sup>[1,615]</sup> Die Ergebnisse sind der **Tabelle 50** zu entnehmen. Nachfolgend wird nun auf die einzelnen Parameter eingegangen.

Damit aus einem *in vitro* wirksamen Molekül ein effektiver Wirkstoff wird, muss dieses sein potenzielles Target im menschlichen Körper in ausreichender Konzentration erreichen und dort in seiner bioaktiven Form lange genug verweilen, damit ein erwarteter Effekt auch tatsächlich eintritt. Neben der Freisetzung aus der Darreichungsform und der Aufnahme des Wirkstoffs in den Körper und dessen Verteilung, sind auch seine Verstoffwechselung und Ausscheidung maßgeblich für seine Konzentration am Wirkort. All jene Vorgänge werden unter dem Akronym ADME (A = Absorption; D = Distribution; M = Metabolismus und E = Elimination) zusammengefasst (**Abb. 189**).<sup>[616,617]</sup>



**Abbildung 189:** Schematische Darstellung pharmakokinetischer Abläufe (ADME): Absorption im Magen/Dünndarm; Distribution über den Blutkreislauf; Metabolisierung in der Leber; Elimination über Dickdarm/Niere

Weiterhin entscheidend sind auch Interaktionen mit anderen Molekülen als dem Zielprotein, die zu unerwünschten Nebenwirkungen führen können. Die Pharmakokinetik beschäftigt sich mit dem zeitlichen Ablauf und der Quantifizierung dieser Prozesse, vereinfacht gesagt, der Wirkung des Organismus auf die Substanz. Da die systematische Bestimmung pharmakokinetischer Eigenschaften kostspielig ist und ungenügend pharmakokinetische Eigenschaften den Ausschluss eines Entwicklungskandidaten bedeuten können, hat man Regeln und Computermodelle entwickelt, die eine Vorhersage der ADME-Parameter erlauben. Hierzu zählt die *rule of five*, eine Faustregel, die von LIPINSKI aufgestellt wurde, um eine Aussage über die orale Bioverfügbarkeit einer chemischen Verbindung zu treffen.<sup>[618]</sup> Die Regeln wurden aus Erfahrungswerten abgeleitet, wonach viele gängige Arzneistoffe relativ kleine und lipophile Moleküle sind. Demnach hat eine Substanz eine gute orale Bioverfügbarkeit und gute Verteilungseigenschaften, wenn sie nicht mehr als zwei der folgenden Bedingungen verletzt:

- 1.) nicht mehr als fünf Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen
- 2.) nicht mehr als zehn Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen
- 3.) eine Molekülmasse von nicht mehr als 500 Dalton ( $MW \leq 500 \text{ Da}$ )
- 4.) einen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von maximal 5 ( $\log P \leq 5$ )

Der Name „*rule of five*“ ist darauf zurückzuführen, dass alle Zahlenwerte gleich fünf sind oder ein geradzahliges Vielfaches davon betragen. Von der Regel ausgenommen sind insbesondere Verbindungen mit aktivem Transportmechanismus wie bestimmte Antibiotika, Antimykotika Herzglykoside oder Vitamine.<sup>[618]</sup>

Nicht minder wichtige Voraussetzung, um vom Ort der Applikation zum Wirkort zu gelangen, ist die Wasser- und Lipidlöslichkeit einer Substanz. So muss diese auf ihrem Weg in einem biologischen System sowohl wässrige Phasen als auch Lipidmembranen durchdringen und gelangt abhängig von ihren physiko-chemischen Eigenschaften in unterschiedliche Kompartimente. Für polare Substanzen stellen Lipidmembranen Barrieren dar, die sie nicht überwinden können. Lipophile Substanzen indessen sind in wässriger Phase schlecht löslich und verbleiben bevorzugt in den Membranen. Nur Substanzen mittlerer Lipophilie sind in der Lage, sowohl wässrige als auch Lipid-Phasen gut zu überwinden und an ihren Wirkort in ausreichender Konzentration zu gelangen. Zur Abschätzung von Lipophilien gibt es den Verteilungskoeffizienten  $P$  (*partition coefficient*), der die Verteilung einer Substanz in Phasen unterschiedlicher Lipophilie wiedergibt. Als Modellsystem betrachtet man die Verteilung zwischen einer Wasser- und Octanolphase.<sup>[619]</sup> Dabei setzt man die Konzentrationen der

nichtionisierten Form einer etwaigen Verbindung in den zwei Phasen ins Verhältnis. In der Regel wird der Logarithmus der Größe angegeben.

Es gilt:

$$\log P(\text{Octanol/Wasser}) = \log \left( \frac{\text{Konz. (gelöste Verbindung)}_{\text{Octanol}}}{\text{Konz. (gelöste Verbindung)}_{\text{Wasser}}} \right)$$

Der Wert ist größer als eins, wenn sich eine Substanz stärker in der Octanolphase anreichert, hingegen kleiner als eins, wenn sie besser in Wasser löslich ist. Der clogP-Wert ist eine aus Inkrementen berechnete Größe, zur Abschätzung der Lipophilie. C steht dabei für calculated. Der S-Wert wiederum gibt die quantitative Wasserlöslichkeit einer Substanz in mol/L bei pH = 7,5 und 25 °C an. Auch hiervon wird in der Regel der Logarithmus genommen. Etwa 80% aller auf den Markt verfügbaren Wirkstoffe haben einen  $\log S \geq -4$ .<sup>[1]</sup>

Eng verknüpft mit der Lipophilie eines Moleküls, ist dessen Hautpermeabilität, die durch den Permeabilitätskoeffizient Kp in cm/s charakterisiert wird. Je negativer der log(Kp) ist, umso weniger hautpermeabel ist ein Molekül, was die Applikation eines Wirkstoffs über die Haut erschwert.<sup>[620]</sup>

Eine andere Form der Aufnahme eines Wirkstoffs ist die orale Applikation. Nach Freisetzung des Wirkstoffs aus seiner Darreichungsform beginnt die Absorption, also der Übertritt aus dem Verdauungsbrei im Magen und Darm in den Blutkreislauf (gastrointestinale Absorption). Die Aufnahme über die einzellige Schicht der Darmzellen erfolgt mittels: (1) transzellulärer, passiver Diffusion, (2) mit Hilfe von Transportern und Kanälen, (3) durch Transzytose mit Vesikeln oder durch (4) parazelluläre, passive Diffusion. Die Absorption ist dabei wesentlich von den physiko-chemischen Eigenschaften (pK<sub>s</sub>, Lipophilie, Löslichkeit) abhängig.<sup>[616]</sup>

*In vitro* lässt sich die intestinale Absorption anhand des Permeabilitätsverhaltens einer Substanz durch die Membran von Adenocarcinom-Zellen (Caco-2-Zellen) bestimmen, die Rückschlüsse auf den Absorptionsprozess in den Dünndarmabschnitten nach oraler Applikation zulässt.<sup>[621]</sup>

Permeabilitätskoeffizienten in [10<sup>-6</sup> cm/s] von > 10 geben dabei einen Hinweis auf eine gute Absorption von über 90% nach oraler Applikation. Eine mittlere Absorption von etwa 40-70% entspricht einem Permeabilitätskoeffizienten von 0,1 bis 1. Nimmt der Permeabilitätskoeffizient indessen Werte < 0,1 an, ist eine schlechte Absorption zu erwarten.<sup>[622]</sup>

Ein Übergang vom Blutkreislauf zum zentralen Nervensystem ist über die Blut-Hirnschranke (*blood-brain barrier*; BBB) strikt reguliert. Hierbei handelt es sich um eine hochspezifisch permeable Membran die das Gehirn vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen und Botenstoffen schützt. Die meisten Arzneistoffe können diese Barriere nicht überwinden. Unter Berücksichtigung der Lipophilie, Ladung, molaren Masse und



der Fähigkeit eines Moleküls, H-Brücken auszubilden, lassen sich Vorhersagen treffen, ob eine Verbindung zum Durchtritt der BBB fähig ist.<sup>[623,624]</sup> Sofern eine Substanz nicht auf das zentrale Nervensystem wirken soll, sollte sie die Blut-Hirnschranke nicht überwinden können.

Ebenso wichtig ist es zu wissen, welche Interaktionen ein Molekül mit Cytochrom-P450-Enzymen eingeht, die die weitaus größte Bedeutung für die oxidative Biotransformation besitzen und damit auch grundlegend an der Elimination beteiligt sind. CYP-Enzyme werden anhand ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Familien eingeteilt, die durch eine arabische Zahl charakterisiert sind. Die Familien enthalten weiterhin mehrere, mit einem Buchstaben gekennzeichnete Subfamilien. Deren Einzelvertreter werden mit einer weiteren Zahl gekennzeichnet. Etwa 50-90% therapeutisch verabreichter Moleküle sind Substrate der fünf Isoformen CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4.<sup>[625]</sup> Dadurch, dass einige Medikamente über dasselbe Isoenzym abgebaut werden, treten dort besonders viel Arzneimittelinteraktionen auf. Die Inhibition eines dieser Isoenzyme kann nun also dazu führen, dass es zur Akkumulation und damit zu einem Anstieg der Plasmakonzentration eines Wirkstoffs kommt, da dieser nicht mehr abgebaut und eliminiert wird. Die Inhibition führt damit zu toxischen und unerwünschten Nebenreaktionen, weshalb ein Wirkstoff im Idealfall nicht als Inhibitor eines der CYP-Enzyme fungiert. Es sind mehrere Fälle bekannt, wo die Interaktion mit CYP-Enzymen dazu geführt hat, dass Wirkstoffe im Nachhinein vom Markt zurückgezogen wurden.<sup>[626,627]</sup>

Ein anderes Protein, das an der Ausscheidung von Wirkstoffen beteiligt ist, ist das P-Glykoprotein (*permeability glycoprotein*; P-gp). Dieses ist unter anderem im Darm, in der Leber, an der Blut-Hirn-Schranke, an der Plazenta und der Niere lokalisiert. P-gp ist in der Zellmembran verankert und bildet einen aktiven Transporter, der unter ATP-Verbrauch Fremdstoffen, die in die Zelle eingedrungen sind, in den extrazellulären Raum transportiert. Damit verringert es die Substanzkonzentration dieser Stoffe am Wirkort.<sup>[628,629]</sup> Ein Wirkstoff sollte damit nicht Substrat des P-Glykoproteins sein, da dadurch seine Ausscheidung gefördert wird.

Unter der Bioverfügbarkeit (biologische Verfügbarkeit F) eines Wirkstoffs versteht man, wie schnell und in welchem Umfang dieser aufgenommen wird und am Wirkort zur Verfügung steht. Bei intravenöser Applikation beträgt die Bioverfügbarkeit definitionsgemäß 100 Prozent. Der *bioavailability-score* (ABS) ermöglicht es die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs bei oraler Gabe abzuschätzen.<sup>[630]</sup> Demnach gibt es fünf Kategorien (ABS = 0,85; 0,56; 0,55; 0,17 und 0,11). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Substanz eine hohe humane Bioverfügbarkeit  $\geq 80\%$  hat, ist größer, je höher der ABS ist. Ein ABS von 0,11 ist hingegen ein Anhaltspunkt für eine schlechte Bioverfügbarkeit  $< 20\%$  F. In die Berechnung des ABS fließen neben der polaren

Oberfläche eines Moleküls und damit der Oberflächensumme über alle polaren Atome, die Ladung eines Moleküls bei pH = 6-7 ein. Weiterhin berücksichtigt wird, ob ein Molekül der „rule of five“ entspricht und welches Permeabilitätsvermögen es besitzt.

Die Bioverfügbarkeit wiederum fließt auch in die Bewertung der *druglikeness* eines Moleküls mit ein, die eine Aussage darüber ermöglicht wie wirkstoffähnlich eine Verbindung ist. Berücksichtigt werden hierbei außerdem die Wasser- und Fettlöslichkeit sowie die Fähigkeit auf ein mögliches biologisches Target zu wirken. Ein hoher pIC<sub>50</sub>-Wert, ist hierfür ausschlaggebend. Es gilt:  $pIC_{50} = -\log(IC_{50})$ , wobei der IC<sub>50</sub> die Konzentration ist, bei der die halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Ein hoher pIC<sub>50</sub>-Wert reduziert das Risiko unspezifischer Interaktionen und damit von *off-target*-Effekten. Auch Größen wie die Ligandeneffizienz (*ligand efficiency*; LE) und Lipophilieeffizienz (*lipophilic efficiency*; LiPE) finden hier oftmals Verwendung.<sup>[631,632]</sup> Die LE ist ein Maß der Bindungsenergie pro Atom eines Liganden zu seinem Rezeptor oder Enzym, mit  $LE = \left(\frac{\Delta G}{N}\right)$ . Dabei ist ΔG die Änderung der freien Gibbs-Energie bei Ligandenbindung, N steht für die Anzahl von Atomen, ausgenommen der Wasserstoffatome, in einem Molekül. Die Gleichung lässt sich vereinfachen zu:  $LE = \frac{1,4 \cdot pIC_{50}}{N}$ . Die LiPE wiederum verknüpft die Lipophilie eines Moleküls mit dessen Wirksamkeit.<sup>[633]</sup> Es gilt:  $LiPE = pIC_{50} - \log P$ . Zudem spielt das Molgewicht eine Rolle, da kleinere Moleküle besser diffundieren können. Es gibt letztlich mehrere Modelle, die *druglikeness* zu bewerten. Vereinfacht lässt sich sagen, dass etwaige Moleküle *in silico* in Fragmente zerlegt werden, die dann mit einer Datenbank abgeglichen werden. Kommt ein etwaiges Fragment in einem bekannten Wirkstoff vor, wird jene Verbindung mit einem höheren *Score* bepunktet. Positive Werte stehen demnach für eine größere Wirkstoffähnlichkeit.

Ebenso wichtig ist es zu klären, ob eine Substanz mutagen, kanzerogen oder teratogen auf den menschlichen Organismus wirkt. Etwaige Daten werden zumeist aus Tierversuchen erhalten. Erste Erkenntnisse, ob eine Substanz zellschädigend ist, liefern Zellviabilitätstests an beispielsweise HepG2-Zellen durch den Nachweis enzymatischer Aktivität oder aber im Falle einer geschädigten Membran durch den Anteil freigesetzter zellulärer Komponenten in das Zellkulturmedium.<sup>[616]</sup> Mutagene können indessen auch mittels Ames-Test identifiziert werden.<sup>[634]</sup> Dabei finden Bakterien Verwendung, die nicht in der Lage sind, die Aminosäure Histidin zu synthetisieren (Histidin-Auxotrophie). Diese Bakterien werden auf einem Nährboden ausgestrichen, der frei von Histidin ist. Da die Bakterien jedoch zum Wachsen und Überleben auf Histidin angewiesen sind, können sie sich folglich nicht vermehren und sterben ab. Setzt man die Bakterien hingegen zusätzlich einem Mutagen aus, so erlangen sie ihre Fähigkeit zur Synthese der Aminosäure durch Mutation (meist Punktmutation) zurück, und es

bilden sich neu Bakterienkolonien, sogenannte Revertanten. Die Kanzerogenität wie auch die Mutagenität lassen sich zudem anhand der Betrachtung der Fähigkeit einer Substanz in die DNA zu interkalieren oder als Elektrophil mit anderen biologischen Nucleophilen zu reagieren, abschätzen. So werden bestimmte Strukturmerkmale (*structural alerts* oder *toxicophore*) mit Toxizität in Verbindung gebracht.<sup>[635,636]</sup> Auch müssen dabei mögliche Metaboliten berücksichtigt werden, da diese ebenso toxisch reagieren können. Ob eine Substanz stark metabolisiert wird, lässt sich anhand ihrer mikrosomalen Stabilität abschätzen.<sup>[637]</sup> Die mikrosomale Stabilität lässt einen Rückschluss auf den *first-pass*-Effekt und damit die Umwandlung eines Arzneistoffes während dessen erster Passage durch die Leber zu. Dabei wird die Substanz zunächst für einen bestimmten Zeitraum Lebermikrosomen oder Leberepithelzellen (Hepatozyten), die CYP-Enzyme enthalten, ausgesetzt. Anschließend wird die verbliebene Substanzmenge dann mittels LC-MS-Analyse bestimmt. Je mehr an Ausgangssubstanz nachweisbar ist, desto weniger unterliegt diese einer metabolischen Transformation. Dieses Verfahren ermöglicht auch eine genaue Analyse entstandener Metaboliten. Außer der Kanzerogenität und Mutagenität lässt sich auch die Reproduktionstoxizität anhand von Strukturmerkmalen vorhersagen.<sup>[638]</sup>

Sofern eine chemische Verbindung, die gegenüber einem biologischen System Aktivität zeigt, aus einem *High-Throughput Screening* (HTS) und damit aus einem automatisierten Testverfahren stammt, bei dem umfangreiche Molekülbibliotheken nach biologisch aktiven Substanzen durchsucht werden, gilt es zu klären, ob diese ein PAIN darstellt. PAINS (*Pan-assay interference compounds*) sind chemische Verbindungen, die dazu neigen, nicht-spezifisch mit einer Vielzahl von biologischen Targets zu reagieren, anstatt ein spezifisches Target gezielt zu beeinflussen. Damit verursachen sie falsch positive Ergebnisse. Bestimmte Strukturmotive erhöhen dabei die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Inhibition und lassen sich mittels Datenbankabgleich herausfiltern.<sup>[639]</sup>

Weitere wichtige Parameter, die es zu bestimmen gilt, sind die Plasmaproteinbindung und damit die reversible Bindung eines Wirkstoffs an Proteine im Blutplasma.<sup>[640]</sup> Wichtige Vertreter sind hier Albumine, Lipoproteine, Glykoproteine aber auch Globuline. Der an etwaige Proteine gebundene Anteil eines Wirkstoffs, ist pharmakologisch zumeist inaktiv. Je stärker die Plasmaproteinbindung einer Substanz ist, desto weniger Substanzmenge steht den Zielgeweben damit also zur Verfügung. Eine Erhöhung der Dosis ist damit notwendig. Die Plasmaproteinbindung beeinflusst zudem die Halbwertszeit eines Wirkstoffs, da dieser im gebundenen Zustand weder verstoffwechselt noch ausgeschieden werden kann. Auch gilt es, die Aktivität einer Substanz auf den hERG-Kanal (*human Ether-a-go-go Related Gene*), einen

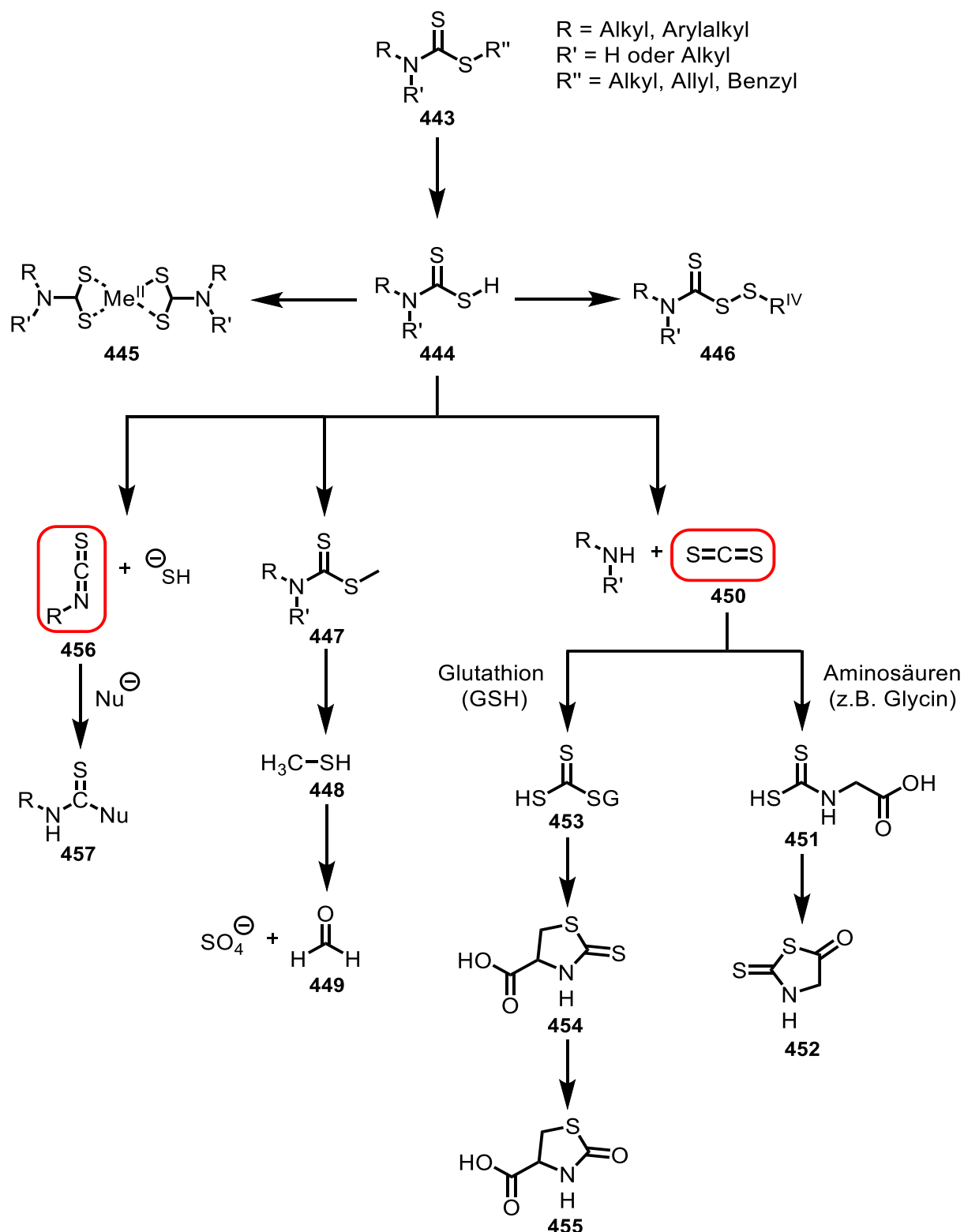
spannungsabhängigen Kaliumkanal in den Herzmuskelzellen, zu überprüfen. So können Interaktionen durch eine Änderung der Repolarisation des Aktionspotenzials zu gefährlichen Herzrhythmusstörungen führen. Der hERG-Kanal gilt damit als Antitarget, an das ein Wirkstoff nicht binden soll.<sup>[641]</sup> Eine Vorhersage ist mit Hilfe des Programmes PreADMET möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Ausnahme von **Schl-33.757**, alle Substanzen der *rule of five* entsprechen. Der clogP-Wert ist in allen Fällen positiv und nimmt zumeist Werte zwischen 2 und 4 an. Damit sind alle Substanzen besser in Octanol als in Wasser löslich. Eine bessere Wasserlöslichkeit zeigen vor allem die Schwefelsäurediamide **Schl-33.292** und **Schl-33.779** mit einem clogP-Wert < 1. Die schlechteste Wasserlöslichkeit hat der Harnstoff **Schl-33.691** mit einem clogP-Wert > 4. Die mäßige Wasserlöslichkeit der Substanzen spiegelt sich auch in einem clogS-Wert < -4 wider. Insbesondere die soeben erwähnten Schwefelsäurediamide die sich durch **Schl-33.692** und **Schl-33.678** ergänzen lassen, sowie die Phenolether **Schl-33.706** und **Schl-33.509** haben einen clogS-Wert > -4. Der vorhergesagte Permeabilitätskoeffizient der Haut, der jedoch für den angestrebten Zweck als Schistosomenmittel eine eher untergeordnete Rolle spielt, liegt für die meisten der Substanzen zwischen -6 cm/s und -8 cm/s. Schlechter hautpermeabel sind demnach die Schwefelsäurediamide **Schl-33.292**, **Schl-33.779** und **Schl-33.757**. Am besten hautpermeabel sind die Sulfonamide **Schl-33.536** und **Schl-33.081**. Die vorhergesagte GI-Absorption ist im Allgemeinen mittlerer Intensität. So liegt die berechnete Caco-2-Permeabilität der Dithiocarbamat-Derivate für die meisten der Substanzen zwischen  $1 \cdot 10^{-6}$  cm/s und  $2,5 \cdot 10^{-6}$  cm/s. Schlechter permeabel ist das Schwefelsäurediamid **Schl-33.779** mit einer Permeabilität von  $0,14 \cdot 10^{-6}$  cm/s. Das Harnstoff-Derivat **Schl-33.691** (42,3 nm/s) und das Thioharnstoff-Derivat **Schl-33.567** (42,0 nm/s) besitzen die vermeintlich beste GI-Absorption. Keine der Substanzen ist vermutlich in der Lage, die Bluthirnschranke zu passieren. Hinsichtlich der Fähigkeit als CYP-Inhibitor aktiv zu sein, lässt sich sagen, dass alle Verbindungen laut Vorhersage mindestens eine der fünf wichtigsten Isoformen inhibieren. Am seltensten wird dabei jedoch die CYP1A2 gehemmt. Nur die Schwefelsäurediamide **Schl-33.292** und **Schl-33.779** interagieren ausschließlich mit einer Isoform. Die Schwefelsäurediamide **Schl-33.438** und **Schl-33.757** sind hingegen vermeintliche Inhibitoren von zwei Isoformen. Alle anderen Substanzen hemmen drei beziehungsweise vier von fünf Isoformen. Eine CYP-Inhibition ist jedoch bei NTDs ebenso von geringerer Bedeutung, da Arzneimittelinteraktionen in Drittweltländern, wo die Arzneimittelversorgung an sich noch problematisch ist, eher eine untergeordnete Rolle spielen. Die Schwefelsäurediamide **Schl-33.292**, **Schl-33.779**, **Schl-33.757**, **Schl-33.692** und **Schl-33.678** sowie das Harnstoff-

Derivat **Schl-33.691** sind zudem möglicherweise Substrat des P-Glykoproteins. Die Vorhersage der Bioverfügbarkeit indessen ist mit einem *Score* von 0,55 für alle Derivate gut. Sie ist der zweithöchsten von fünf Kategorien zuzuordnen. **Schl-33.757** weicht hiervon stark ab und ist mit einem Score von 0,17 schlecht bioverfügbar. Als *druglike* eingestuft werden **Schl-33.635**, **Schl-33.567**, **Schl-33.678**, **Schl-33.656** und **Schl-33.706**, was in diesem Fall aber nur bedeutet, dass sich gewisse Struktur motive der Substanzen in bereits bestehenden Wirkstoffen wiederfinden. Alle Verbindungen werden zudem als toxisch eingestuft, was ihre Fähigkeit anbelangt, mutagen und kanzerogen zu wirken. Die Wahrscheinlichkeit, teratogen zu wirken, ist hingegen niedrig. Dieser Umstand ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Vorhersage der Toxizität einer Substanz auf Grundlage des Abgleichs von toxicophoren Gruppen erfolgt. Insbesondere die Nitro-Gruppe wird aufgrund ihrer ausgeprägten Metabolisierung und der im Zuge dieser entstehenden reaktiven Metaboliten als *structural alert* gewertet. Dennoch gibt es zahlreiche Beispiele für Wirkstoffe, die eine Nitro-Gruppe tragen. Diese wurden in der Einleitung umfassend dargestellt.

Auch Dithiocarbamat-Derivate unterliegen einer ausgeprägten Metabolisierung, bei der potenziell toxische Produkte entstehen (**Schema 96**). Alle Erkenntnisse diesbezüglich leiten sich von dem humanen ALDH-Inhibitor Disulfiram als Arzneistoff zur Unterstützung der Abstinenz bei Alkoholabhängigkeit (nicht mehr zugelassen) oder den Pflanzenschutzmitteln wie beispielsweise Metam ab.<sup>[278,285,642]</sup> Der hypothetische Pfad der Metabolisierung aller Dithiocarbamat-Derivate läuft dabei über die Thiocarbamidsäure (**444**). Diese kann entweder Metallionen im aktiven Zentrum eines Enzyms komplexieren (**445**) oder mit einem Cystein-Molekül ein Dithiocarbamat-Disulfid (**446**) bilden und dadurch als Inhibitor wirken. Auch kann die Dithiocarbamidsäure nach vorhergehender Methylierung und damit Bildung von **447**, die toxischen Abbauprodukte Methanthiol (**448**) und Formaldehyd (**449**) bilden oder in ein Amin und das stark toxische Kohlenstoffdisulfid (**450**) gespalten werden.

Kohlenstoffdisulfid wiederum ist in der Lage, mit Aminosäuren wie Glycin zu **451** zu reagieren. Die so gebildeten Produkte zyklisieren zum 2-Thioxo-thiazolidin-5-on (**452**), das ebenfalls zytotoxisch ist. Die Reaktion von Kohlenstoffdisulfid mit Glutathion führt demgegenüber zur Bildung von 2-Thioxothiazolidin-4-carbonsäure (**454**) und dem desulfurylierten Produkt **455**, die das Potenzial besitzen, toxisch zu sein. Die Tatsache, dass die Dithiocarbamate als potenzielle CYP-Inhibitoren gelten, ist vermutlich ebenfalls auf das Metabolisierungsprodukt Kohlenstoffdisulfid zurückzuführen, das ein potenter Inhibitor von CYP-Enzymen ist.

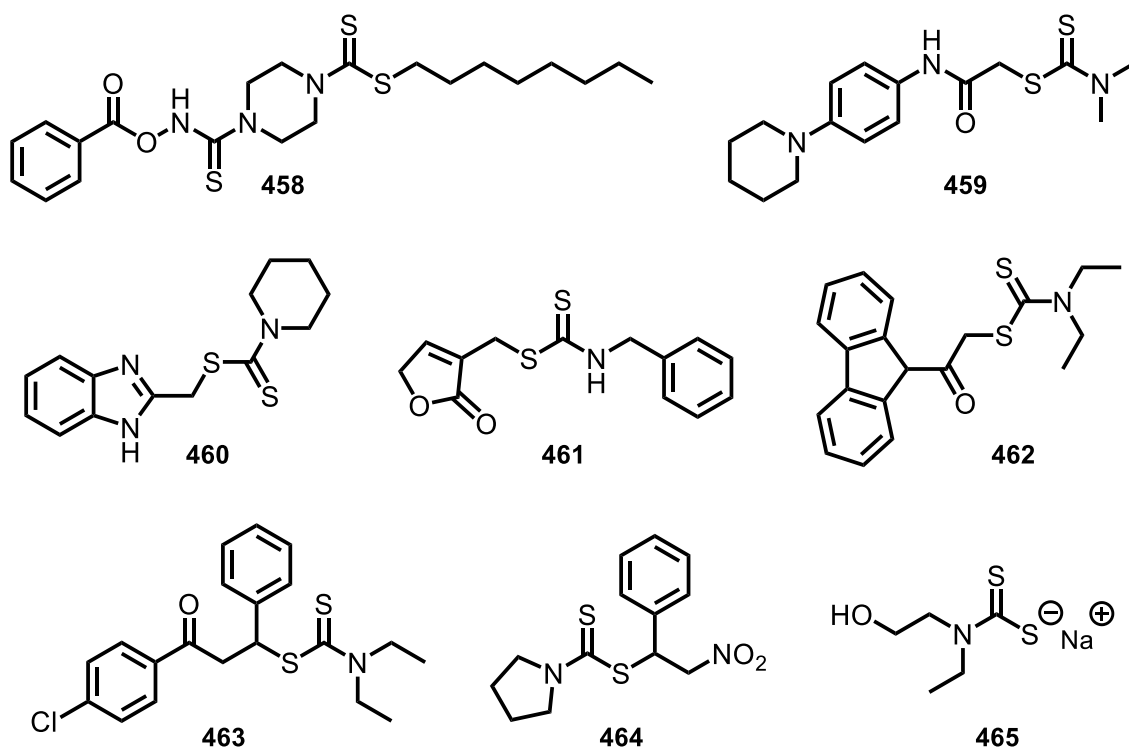


**Schema 96:** Mögliche Metaboliten und Reaktionsprodukte der Dithiocarbamat-Derivate ausgehend von Dithiocarbamidsäure mit zytotoxischem Profil (rot umrandet sind die hochreaktiven Spezies; insbesondere die Bildung von 446 ist auch direkt über 443 möglich; überarbeitet nach HAENDEL *et al.* und BERLIN)<sup>[278,285,642]</sup>

Die Metabolisierung ist stark von den Resten der Heteroatome in der Dithiocarbamat-Grundstruktur abhängig. So ist zum einen die Oxidation in  $\alpha$ -Position zum einfach gebundenen Schwefelatom des Dithiocarbamats, die über einen radikalischen Mechanismus verläuft und

zur Bildung der Dithiocarbamidsäure führt, besonders günstig, wenn der Rest R" ein Benzyl- oder Allyl-Rest ist. Demnach sollte der Austausch der Wasserstoffatome in der Benzylposition all der Verbindungen mit Benzylsubstituenten am einfach gebundenen Schwefelatom des Dithiocarbamats gegen Fluoratome zu einer biotransformativen Stabilisierung führen und wäre damit für Folgearbeiten interessant. Sofern einer der beiden Reste R bzw. R' hingegen ein Wasserstoffatom ist, ist als Metabolisierungsprodukt auch ein Isothiocyanat (**456**) denkbar, das gleichwohl toxisch wirkt. Das Isothiocyanat kann im Weiteren dann von einem Stickstoff- oder Schwefelatom eines Biomoleküls nucleophil angegriffen werden und dieses kovalent binden (**457**). Weiterhin umfasst die Metabolisierung der Dithiocarbamate wie anhand von Disulfiram bereits in **Schema 4** (S. 23) gezeigt, schrittweise Oxidationen beispielsweise zum Dithiocarbamat-S-dioxid (**42**) sowie einen Schwefel-Sauerstoff-Austausch zum Thiocarbamat (**40**).

Trotz möglicher toxischer Abbauprodukte gibt es (wie im Fall der Nitro-Gruppe) Beispiele für Dithiocarbamat-Derivate, die einen pharmazeutischen Nutzen haben und von denen einige nachfolgend kurz aufgeführt werden (**Abb. 190**). Dazu zählt beispielsweise Verbindung **458**, die als vaginales Mikrobiozid zur HIV-Prävention entwickelt wurde, die reverse Transkriptase inhibiert und außerdem gegen Spermien aber auch den Parasiten *Trichomonas vaginalis* aktiv ist.<sup>[643]</sup> Verbindung **459** indessen entstand als potenzieller Inhibitor der Acetylcholinesterase zur Behandlung von Alzheimer, zeigte aber keine inhibitorische Wirkung. Stattdessen war **459** gegen alle Arten von *Candida*, eine Gattung von Hefepilzen des Menschen aktiv.<sup>[644]</sup> Dithiocarbamat-Derivate wie **460-463** sind zudem weit verbreitet als potentielle anti-Krebsmittel.<sup>[645-648]</sup> Durch ihre Bindung an Mikrotubuli hemmen sie die Zellteilung und damit den Zellzyklus. **464** zeigt antimikrobielle Eigenschaften. Von einer Wirkung sind unter anderem die Bakterien *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* betroffen.<sup>[649]</sup> Auch sind neben den Estern der Dithiocarbamidsäure, deren Salze wie **465** zum Beispiel als Antidot bei Cadmiumvergiftungen beschrieben.<sup>[650]</sup>



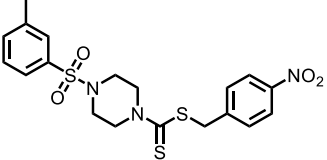
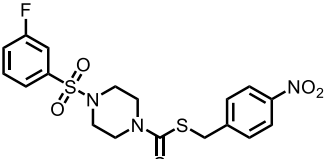
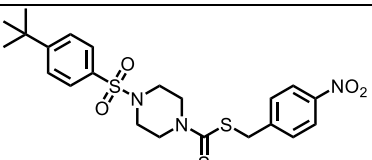
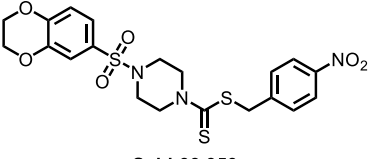
**Abbildung 190:** Strukturformeln von Dithiocarbamat-Derivaten mit pharmazeutischem Nutzen

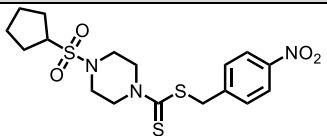
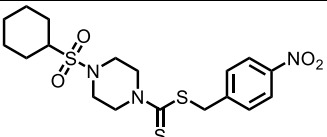
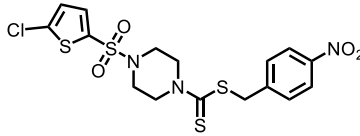
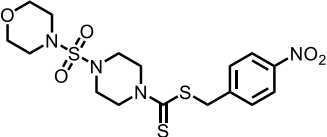
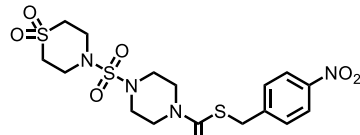
Damit lässt sich die Vorhersage der Toxizität der Substanzklasse der Dithiocarbamate in gewisser Weise relativieren. Computergestützte Vorhersagen basieren auf Erfahrungen und sind ein gutes Hilfsmittel gewisse Entscheidungen bei der Entwicklung eines Wirkstoffs zu treffen. Sie stellen aber lediglich ein Modell dar und bilden nicht die Realität ab, bedürfen damit also auch einer kritischen Interpretation des Anwenders. Nichtsdestotrotz werden die hinter den einzelnen Programmen stehenden Algorithmen immer besser und ermöglichen dadurch auch tatsächlich eine genauere Vorhersage.

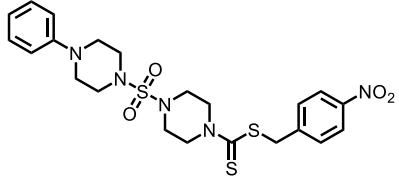
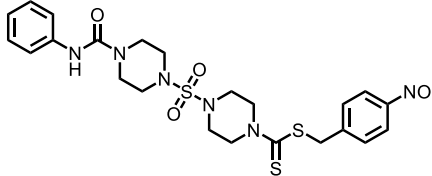
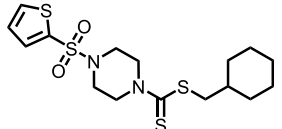
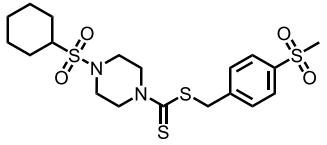
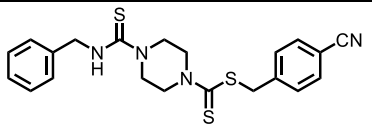
Keine der Substanzen wird als PAIN eingestuft. Unspezifische Effekte sind damit weniger wahrscheinlich. Das gilt auch für die Aggregation, die aufgrund von Löslichkeitsproblemen für eine Wirkung ursächlich sein könnte, und damit besonders berücksichtigt werden sollte. Die Fähigkeit der Dithiocarbamat-Derivate auf den hERG-Kanal zu wirken, ist als niedrig bis mittel einzustufen.

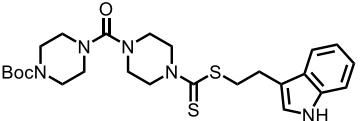
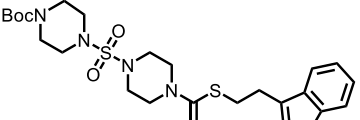
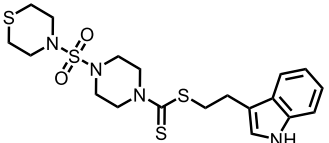
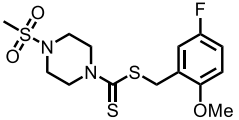
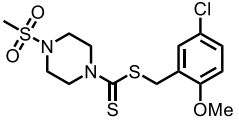
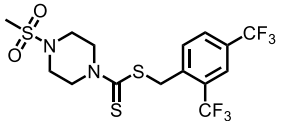


**Tabelle 50:** ADME-Tox-Vorhersagen ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate

Strukturformel	cLogP	cLogS	PAINS	Lipinski	GI-Absorption	Permeabilität BBB	P-gp Substrat	CYP-Inhibitor	Log Kp [cm/s]	Mutagenität	Kanzerogenität	Teratogenität	hERG-Inhibition	Bioverfügbarkeitsscore	druglikeness
 Schl-33.048	2,65	-4,15	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-6,52	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-9,60
 Schl-33.058	2,40	-4,12	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-6,73	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-12,05
 Schl-33.081	3,88	-4,97	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-5,85	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-8,59
 Schl-33.353	2,28	-3,99	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-7,25	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-13,69

Strukturformel	cLogP	cLogS	PAINS	Lipinski	GI-Absorption	Permeabilität BBB	P-gp Substrat	CYP-Inhibitor	Log Kp [cm/s]	Mutagenität	Kanzerogenität	Teratogenität	hERG-Inhibition	Bioverfügbarkeitsscore	druglikeness
 Schl-33.600	2,34	-4,61	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-6,85	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-7,65
 Schl-33.071	2,68	-4,88	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-6,55	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-10,17
 Schl-33.593	3,10	-4,48	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP1A2 CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-6,25	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-5,79
 Schl-33.292	0,73	-2,66	nein	ja	niedrig	nein	ja	CYP2C19	-8,18	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-7,18
 Schl-33.779	0,04	-2,79	nein	ja	niedrig	nein	ja	CYP2C19	-8,81	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-8,98

Strukturformel	cLogP	cLogS	PAINS	Lipinski	GI-Absorption	Permeabilität BBB	P-gp Substrat	CYP-Inhibitor	Log Kp [cm/s]	Mutagenität	Kanzerogenität	Teratogenität	hERG-Inhibition	Bioverfügbarkeitsscore	druglikeness
 Schl-33.438	2,34	-4,01	nein	ja (MW>500)	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9	-7,25	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	-4,57
 Schl-33.757	2,34	-4,13	nein	nein	niedrig	nein	ja	CYP2C9 CYP3A4	-8,17	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,17	-5,81
 Schl-33.536	3,57	-3,24	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-5,74	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-0,39
 Schl-33.635	2,60	-4,84	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-7,17	hoch	hoch	niedrig	niedrig	0,55	0,95
 Schl-33.567	3,79	-5,04	nein	ja	hoch	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-6,30	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	0,06

Strukturformel	cLogP	cLogS	PAINS	Lipinski	GI-Absorption	Permeabilität BBB	P-gp Substrat	CYP-Inhibitor	Log Kp [cm/s]	Mutagenität	Kanzerogenität	Teratogenität	hERG-Inhibition	Bioverfügbarkeitsscore	druglikeness
 Schl-33.691	4,38	-3,76	nein	ja (MW >500)	hoch	nein	ja	CYP2C19 CYP2C9 CYP3A4	-7,59	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-28,49
 Schl-33.692	3,66	-3,40	nein	ja (MW >500)	niedrig	nein	ja	CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-8,04	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-27,91
 Schl-33.678	2,56	-3,20	nein	ja	niedrig	nein	ja	CYP2C19 CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	-7,69	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	5,22
 Schl-33.656	2,00	-3,43	nein	ja	hoch	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9	-7,27	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	4,16
 Schl-33.706	2,51	-3,85	nein	ja	hoch	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP3A4	-6,99	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	5,88
 Schl-33.509	3,67	-4,66	nein	ja	niedrig	nein	nein	CYP2C19 CYP2C9 CYP3A4	-6,60	hoch	hoch	niedrig	mittel	0,55	-16,98

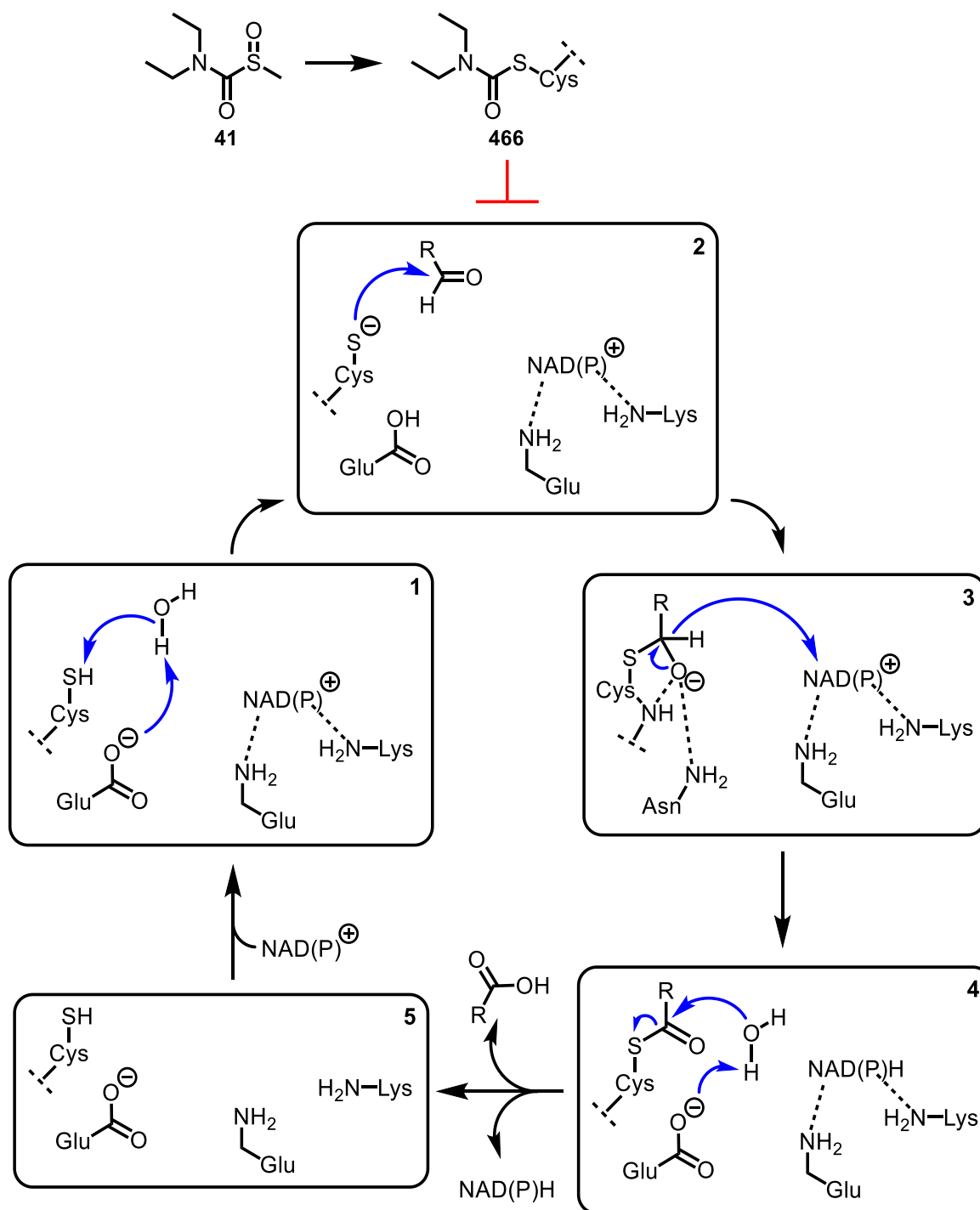
### 3.12.2 Molekulares Docking

Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDHs) wurden als ein mögliches Target der antischistosomal aktiven Dithiocarbamat-Derivate ins Auge gefasst. Alle Dithiocarbamat-Derivate lassen sich auf den humanen ALDH-Inhibitor Disulfiram zurückführen. So hatte das Auffinden orthologer ALDHs (SmALDH1 & 2) im Tegument der Schistosomen zu ersten *in-vitro*-Testungen an adulten Schistosomen mit Disulfiram geführt. Bei 100  $\mu\text{M}$  behandelte Schistosomen zeigten dabei teils gravierende Effekte einschließlich Tegumentblasenbildung sowie der großflächigen Ablösung des Teguments und führten zum Tod des Parasiten. Vermutlich spielen die ALDHs eine Rolle bei der antioxidativen Abwehr. Dies war der Ausgangspunkt der Entwicklung der Dithiocarbamat-Derivate. Die Entwicklung verlief dabei über die Metaboliten des Disulfirams unter sequenziellem Austausch der drei möglichen Reste der Dithiocarbamat-Grundstruktur. Eine Wirkung der Dithiocarbamat-Derivate auf ALDHs ist daher naheliegend, wenngleich sich die Derivate mit fortlaufender Entwicklung immer mehr von ihrem ursprünglichen strukturellen Aussehen entfernten und von diesem immer stärker abwichen.

ALDHs umfassen mehrere Gruppen von Oxidoreduktasen, die Aldehyde oxidieren. Der Katalysemechanismus lässt sich dabei vereinfacht in fünf Schritte unterteilen:<sup>[280]</sup>

(1) Aktivierung eines katalytischen Cysteins durch Wasser-vermittelte Protonenabstraktion durch ein Glutamat und dadurch Bildung eines Thiolatanions, (2) nucleophiler Angriff am elektrophilen Carbonylkohlenstoff-Atom des Aldehyds durch das Thiolatanion, (3) Bildung eines tetraedrisch koordinierten Thiohalbacetals und Hydrid-Transfer auf den Pyridinring von  $\text{NAD}^+$ , (4) Hydrolyse des Thioester-Intermediats, (5) Dissoziation des reduzierten Cofaktors und Regenerierung des Enzyms durch Bindung von  $\text{NAD}^+$ .

Die Wirkung von Disulfiram beruht dabei überwiegend auf der (Thio)carbamoylierung des katalytisch aktiven Cysteins (vgl. **466**; **Schema 97**), die irreversibel ist.<sup>[280]</sup> Die Reaktion verläuft dabei über die zahlreichen Metaboliten von Disulfiram unter gleichzeitiger Bildung von Methanthiol, Methansulfensäure oder Methansulfinsäure. Auch die Dithiocarbamat-Derivate sollten zu einer vergleichbaren Interaktion befähigt sein.



**Schema 97:** Katalysemechanismus der Oxidation vom Aldehyd zur Carbonsäure durch die Aldehyddehydrogenase sowie Carbamoylierung des katalytisch aktiven Cysteins durch nucleophilen Angriff des Thiolats am Carbonylkohlenstoffatom des aktivsten Metaboliten von Disulfiram und dadurch irreversible Inhibition; (1: Wasser-vermittelte Protonenabstraktion, 2: nucleophiler Angriff auf den Aldehyd, 3: Hydrid-Transfer auf NAD<sup>+</sup>, 4: Hydrolyse des Thioesters, 5: Dissoziation des reduzierten Cofaktors; überarbeitet nach KOPPAKA *et al.*)<sup>[280]</sup>

*Bis dato* war es nicht möglich, die potenzielle Wirksamkeit der Dithiocarbamat-Derivate am schistosomalen Enzym nachzuweisen. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass sich das Enzym nur schwer exprimieren und reinigen lässt. Daher sollte nun zunächst ein molekulares *Docking* eine mögliche Bindung der Dithiocarbamat-Derivate an die

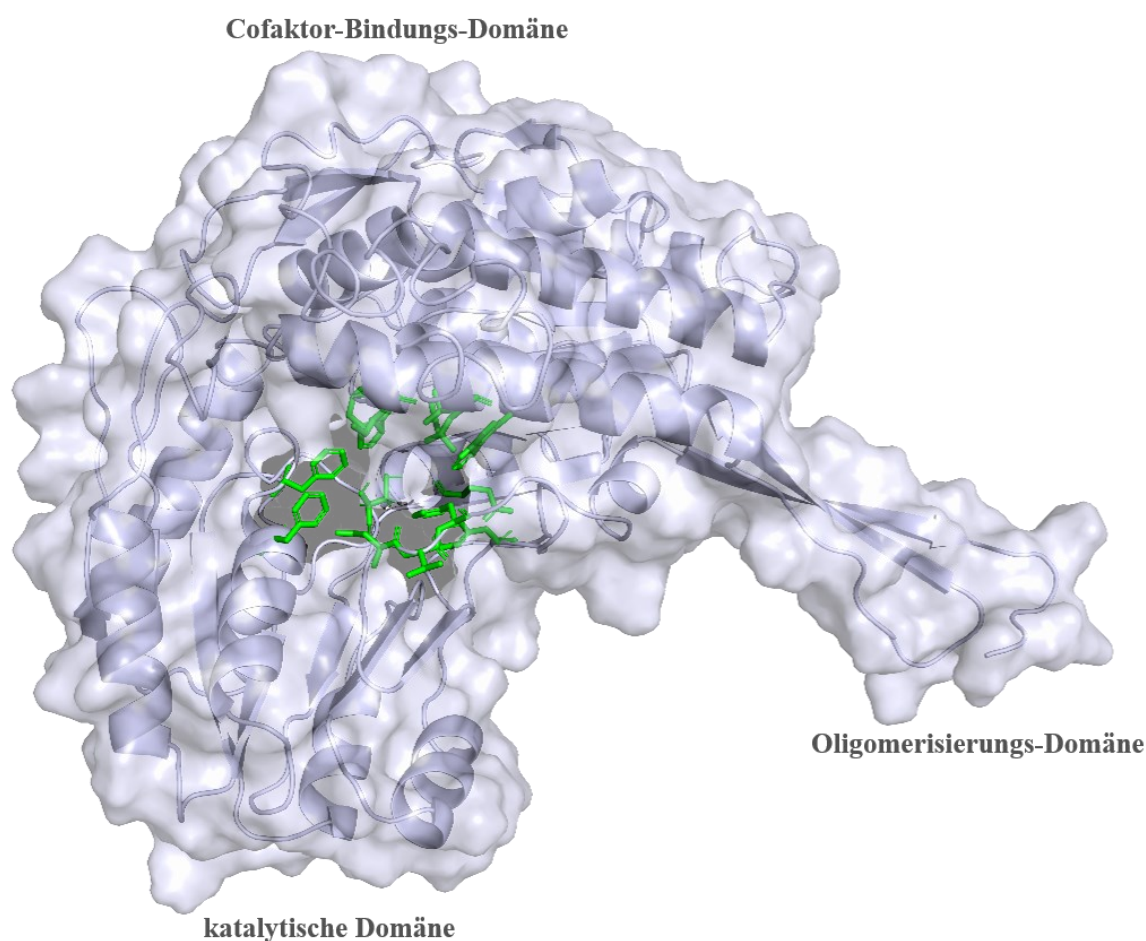
schistosomale ALDH bestätigen. Als Folge des Fehlens einer Kristallstruktur der schistosomalen ALDH musste hierfür ein Homologiemodell erstellt werden. Ein Homologiemodell ist ein Modell des räumlichen Aufbaus eines Proteins mit bekannter Primärstruktur jedoch unbekannter Tertiärstruktur. Dieses kann basierend auf einer homologen, bereits experimentell aufgeklärten dreidimensionalen Struktur berechnet werden. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sequenziell verwandte Proteine häufig einen vergleichbaren räumlichen Aufbau aufweisen. Je höher die Sequenzidentität zwischen Templatstruktur und der zu erstellenden Struktur ist, umso einfacher lässt sich ein Modell anfertigen und umso höher ist auch die Aussagekraft.

Die Berechnung des Homologiemodells erfolgte mit Hilfe der Software *I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement)*.<sup>[651]</sup> *I-TASSER* durchsucht dabei auf Grundlage der Aminosäuresequenz Struktur-Datenbanken nach möglichst ähnlichen, bereits annotierten Teilstrukturen, die daraufhin zu einem hypothetischen Proteinmodell zusammengeführt werden. Zuletzt wird dieses Modell dann mit bekannten Proteinstrukturen der Protein Datenbank (PDB) abgeglichen. Die Güte eines etwaigen Modells lässt sich anhand des C- und TM-Wertes beurteilen. Der C-Wert ist dabei ein Maß für die statistische Signifikanz. Je höher dieser Wert ist, umso besser ist das Modell. Normalerweise liegt der C-Wert im Bereich zwischen -5 bis 2. Die Ähnlichkeit des erstellten Modells zu bekannten Templates wird durch den TM-Wert erfasst, der zwischen 0 und 1 liegt, mindesten aber 0,5 oder mehr betragen sollte. Das Homologiemodell wurde basierend auf der Sequenz des Gens Smp\_022960 erstellt.<sup>[652]</sup> Der C-Wert des Homologiemodells besaß einen Wert von 0,24 und einen TM-Wert von  $0,75 \pm 0,11$ . Die Übereinstimmung des ALDH-Modells mit gelösten Proteinstrukturen war mit einer Teilstruktur der humanen, mitochondrialen Aldehyd-Dehydrogenase (PDB-ID: 1O01), der cytosolischen Aldehyd-Dehydrogenase der Schaafs-Leber (PDB-ID: 1BXS) und der retinalen Aldehyd-Dehydrogenase „Eta-crystallin“ (PDB-ID: 1O9J) am größten. Nachfolgend ist die statistisch wahrscheinlichste Sekundärstruktur des Proteins, die durch *I-TASSER* bestimmt wurde, abgebildet:

```
MVFLYSGSKILGAQAITKNICKFLGTTVEPILKPEIKRNSIFINNEWVESSGKTFDTINPATGKVICQVS
AGDKADIDKAVKAARKAFEGSEWRTMDASHRGVLLNKLADLIERDRVYLASLETLDNGKPFADSYNIDL
LVIKCYRYAGWADKYHGKTI PVNGNYMCFTHLHPVGVCGQIIPWNFPLLMQAWKLGPALATGNTVVMKTA
EQTPLSANWVAELIKEAGFP PGV VNI VPGFGETAGDALV VHPDVKIAFTGSAVGRLLIQNAYKHGVKRI
TLELGKKSPLIIFSDGDFDRAIAASHFGLFFNQGCCASSRIFVEESIYDKFVEYSSEEAKKRIVGNPFD
LNTTQGPQVDEHQFQTVMSYIESGIKEGAKLCTGGKQFGSDGYFIRPTVFADVQDEMSIAREEIFGPMQI
MKFRSLDELIHRANHTQYGLAAGIFTNNLEKAMHVMQHLQGTGTVWINCYDVFDAAAPFGGKYKFSVGREL
EYSLRNYTEVKTVTTRILQKNS
```

**Abbildung 191:** Sekundärstruktur der modellierten ALDH (rot:  $\alpha$ -Helix, blau:  $\beta$ -Strang schwarz: unstrukturierte Coil-Region)

Die dreidimensionale Proteinstruktur der modellierten ALDH lässt sich in drei deutlich voneinander abgegrenzte Regionen einteilen: (1) eine Cofaktor-Bindungs-Domäne in der  $\text{NAD}^+$  gebunden wird, (2) eine katalytische Domäne, in der das Substrat aufgenommen wird und (3) eine Oligomerisierungs-Domäne (**Abb. 192**). Über die Oligomerisierungs-Domäne erfolgt die Oligomerisierung einzelner ALDH-Monomere zu Di- oder Tetrameren mit je einem katalytisch aktiven Zentrum. Zwischen der Cofaktor-Bindungs-Domäne und der katalytischen Domäne liegt die katalytische Tasche (*active site*), die das katalytisch aktive Cystein enthält. Die Aminosäuren des katalytischen Zentrums bilden einen hydrophoben Tunnel.



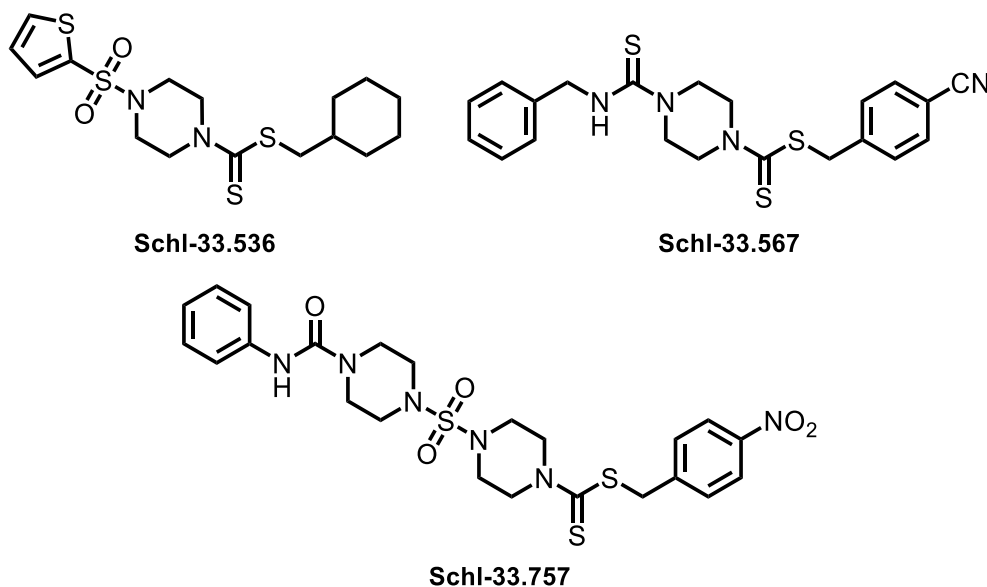
**Abbildung 192:** *Surface Structure* der modellierten Aldehyd-Dehydrogenase bestehend aus katalytischer Domäne, Cofaktor-Bindungs-Domäne und Oligomerisierungs-Domäne (grün eingefärbt sind die Aminosäuren der *active site*; 3D-Grafik erstellt mit der Grafiksoftware PyMOL)

Im nächsten Schritt wurden die vermeintlichen Bindeposen und Bindungsaffinitäten ausgewählter Dithiocarbamat-Derivate am Zielenzym durch Dockingsimulation untersucht. Die Berechnung potenzieller Bindeposen erfolgte mit Hilfe der Software *GOLD* (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*; Hermes/Gold Ver.: 2020.1).<sup>[653]</sup> Dabei wurden durch das Dockingprogramm zunächst potenzielle Bindungsgeometrien berechnet, indem verschiedene Orientierungen des Ligandenmoleküls innerhalb der Bindetasche generiert wurden. Für die



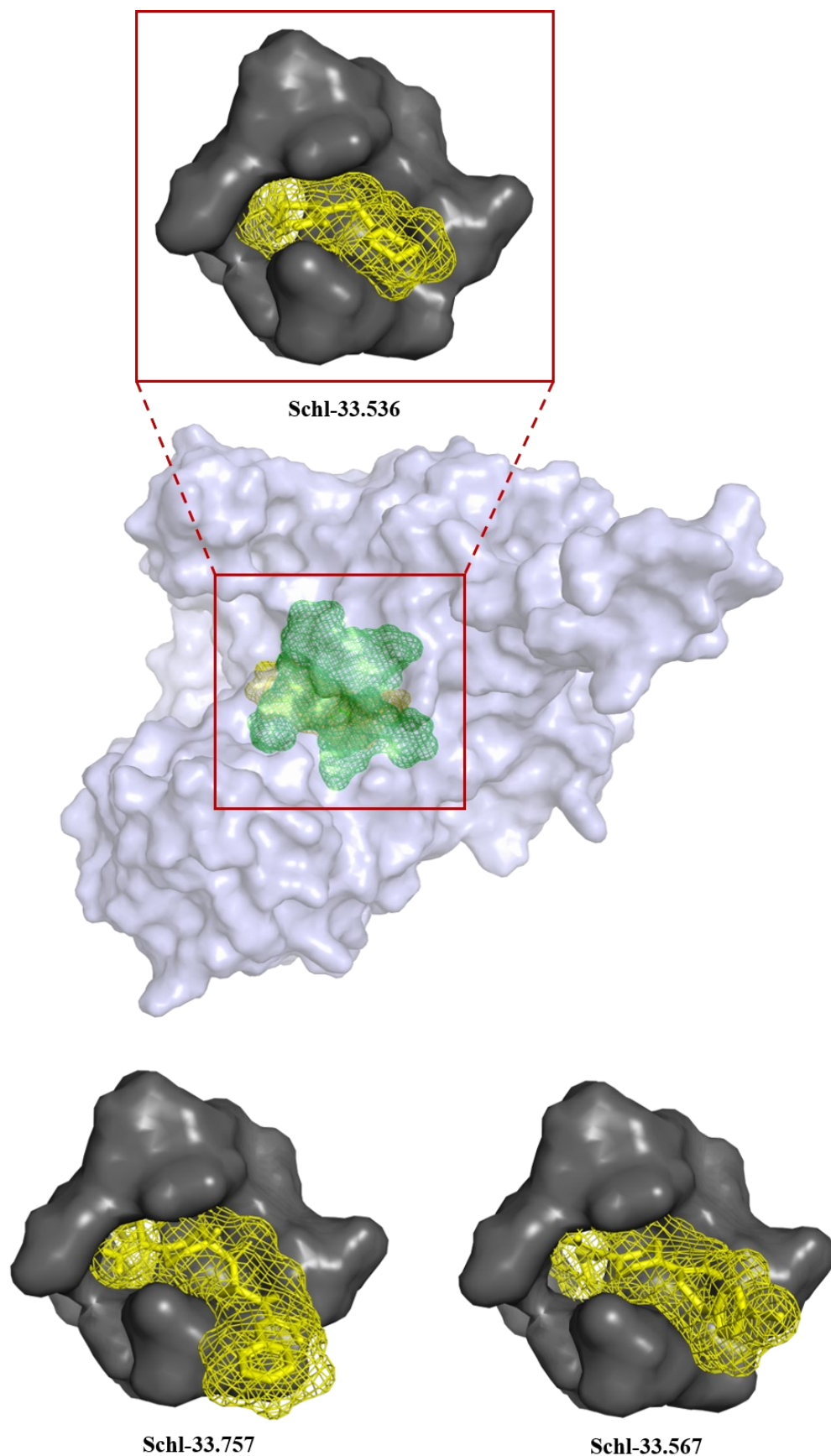
Platzierung der Liganden innerhalb des Enzyms (*binding-site*) wurde das aktive Zentrum gewählt, deren Aminosäuren durch *I-TASSER* vorhergesagt wurden. Die potenziellen Liganden wurden vor dem *Docking* mit der Software *Chem3D* (Version: *Perkin Elmer - Chem3D, Ver.: 19.1.1.21*) Energie-minimiert. Damit wurde die energetisch günstigste Konformation eines jeden Moleküls gefunden. Die Liganden wurden nun so in die Bindetasche gelegt, dass diese die größtmögliche Anzahl an H-Brückenbindungen ausbilden konnten. Es folgte eine Bewertung der Dockinglösungen anhand der Wechselwirkungsenergien durch eine implementierte Scoringfunktion (*Astex Statistical Potential*), wobei ein hoher Energiewert besonders günstig war. Die jeweils vier besten Posen eines Liganden wurden schließlich visuell analysiert und hinsichtlich ihrer räumlichen Anordnung und Bindungsgeometrien sortiert.

Nachfolgend werden die drei besten Dockingposen der Dithiocarbamat-Derivate innerhalb der schistosomalen ALDH exemplarisch gezeigt. Dies sind **Schl-33.536**, **Schl-33.757** und **Schl-33.567**.



**Abbildung 193:** Strukturformeln der ausgewählten Dithiocarbamat-Derivate zur Veranschaulichung der Bindungsposen des Dockings innerhalb der ALDH

Zu sehen ist die Oberflächenstruktur der ALDH, die blau-grau ist. Grün eingefärbt ist das katalytische Zentrum. Dieses wird als Gitternetz (**Abb. 194**) angezeigt und überlagert die gelb eingefärbte Dockingpose von **Schl-33.536**, deren Oberfläche ebenfalls in der Form eines Gitternetzes dargestellt ist. Der Ligand selbst wird als Stabmodell gezeigt. Deutlich sichtbar werden die Schnittmengen der grünen und gelben Gitternetze. So füllt **Schl-33.536** das aktive Zentrum bestmöglich aus und ragt nur an einigen Stellen leicht aus der katalytischen Tasche heraus.

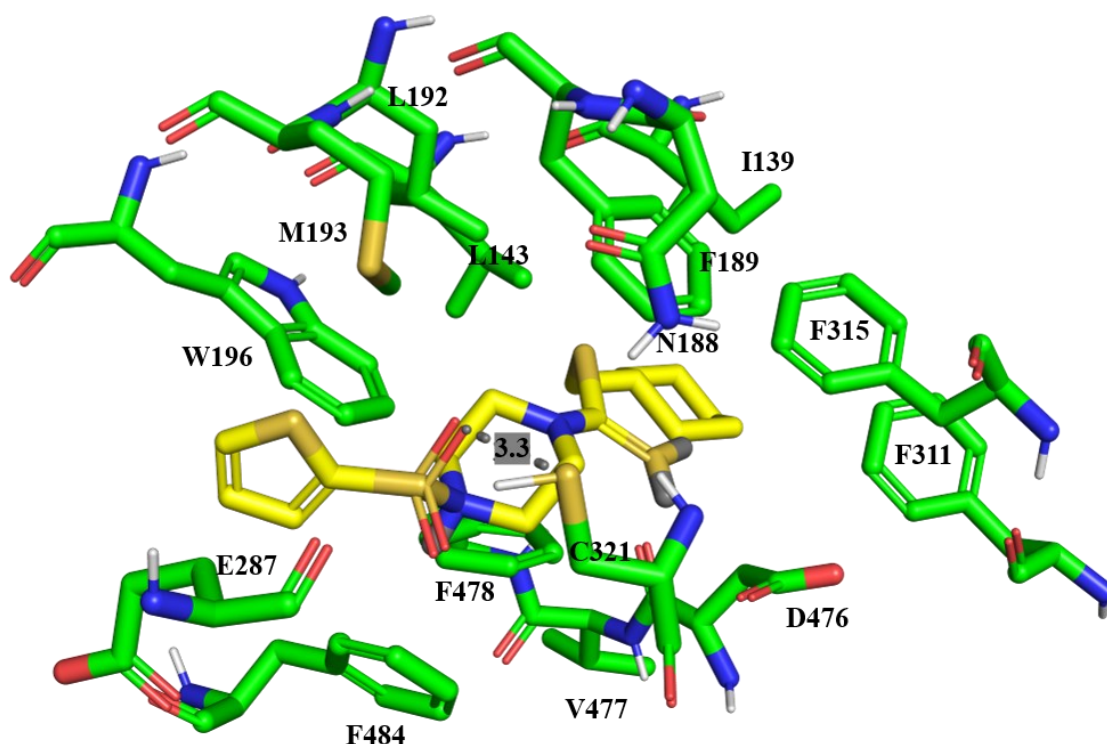


**Abbildung 194:** Mitte: Oberflächenstruktur der modellierten ALDH (blau-grau) sowie Überlagerung des katalytischen Zentrums (grünes Gitternetz) mit dem Liganden **Schl.33-536** (gelbes Gitternetz und Stabmodell); oben: Vergrößerung des aktiven Zentrums (schwarze Oberfläche) inklusive des Liganden **Schl-33.536** (Oberflächendarstellung als gelbes Gitternetz und Stabmodell) unten: aktives Zentrum mit den Liganden **Schl-33.757** und **Schl-33.567**

Die ausschnittsweise Vergrößerung des aktiven Zentrums (schwarze Oberfläche) inklusive der Liganden (Oberflächendarstellung als gelbes Gitternetz und Stabmodell) vermittelt nun einen räumlichen Eindruck der Bindungssituation innerhalb der Tasche. Der Ligand schmiegt sich eng an die Oberfläche des aktiven Zentrums an und blockiert dadurch den durch die Aminosäuren des katalytischen Zentrums gebildeten Tunnel vollständig. Beide Strukturen scheinen wie Schlüssel und Schloss zusammenzupassen. Dadurch scheint die Aufnahme eines Substratmoleküls unmöglich und der Katalysemechanismus unterbunden.

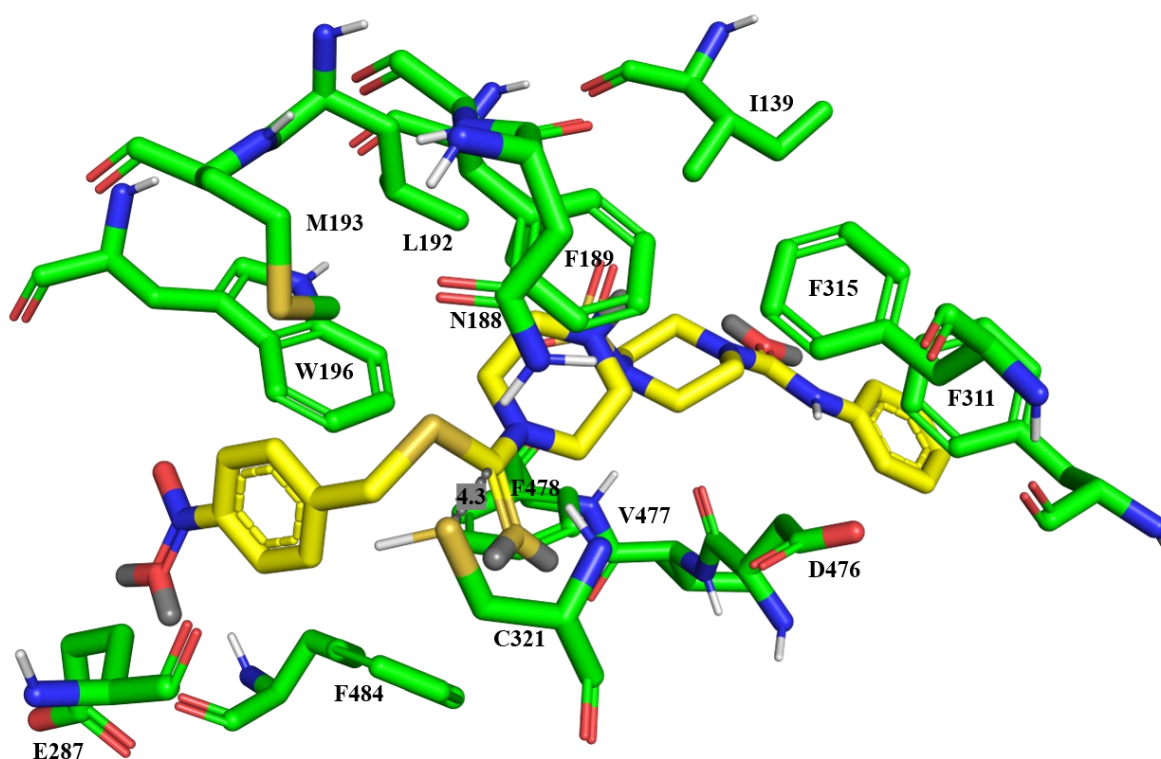
Einzelne Interaktionen der Liganden mit dem Zielenzym werden in der Darstellung, in welcher die einzelnen Aminosäuren des katalytischen Zentrums zu sehen sind, sichtbar. Die Aminosäuren, die das katalytische Zentrum bilden, sind Asparagin 188, Asparaginsäure 476, Glutaminsäure 287, Leucin 143/192, Methionin 193, Phenylalanin 189/484/478 und Tryptophan 196. Das katalytisch aktive Cystein ist C321. Die Darstellung des hydrophoben Tunnels wurde um die Aminosäuren Valin 477, Phenylalanin 311/315 und Isoleucin 139 erweitert, um etwaige Wechselwirkungen, die überwiegend auf hydrophobe Interaktionen begrenzt sind, sichtbar zu machen. Die Gestalt des Tunnels wird dadurch ebenfalls besser deutlich.

**Schl-33.536** ist innerhalb der Bindetasche so orientiert, dass der Thiophenring auf Seiten des Piperazinrings mit Tryptophan 196 in Kontakt steht (**Abb. 195**). Die Sulfonylgruppe, die einen Abstand von etwa 3,3 Å zu Cystein 321 hat, kann zu diesem eine schwache Wasserstoffbrücke ausbilden, sofern diese eine gewinkelte anstelle einer linearen Geometrie besitzt und damit einen Winkel  $S=O\cdots H$  ungleich  $180^\circ$ . Dabei fungiert die Sulfonylgruppe mit ihren freien Elektronenpaaren an den Sauerstoffatomen als H-Akzeptor. Der Cyclohexylmethyl-Rest auf Seiten des einfach gebundenen Schwefelatoms des Dithiocarbamats ist in Richtung der Phenylalanine 189/311/315 orientiert. Die Dithiocarbamat-Funktion indessen ist von Cystein 321 abgewandt und frei von jedweder Art von Wechselwirkung.



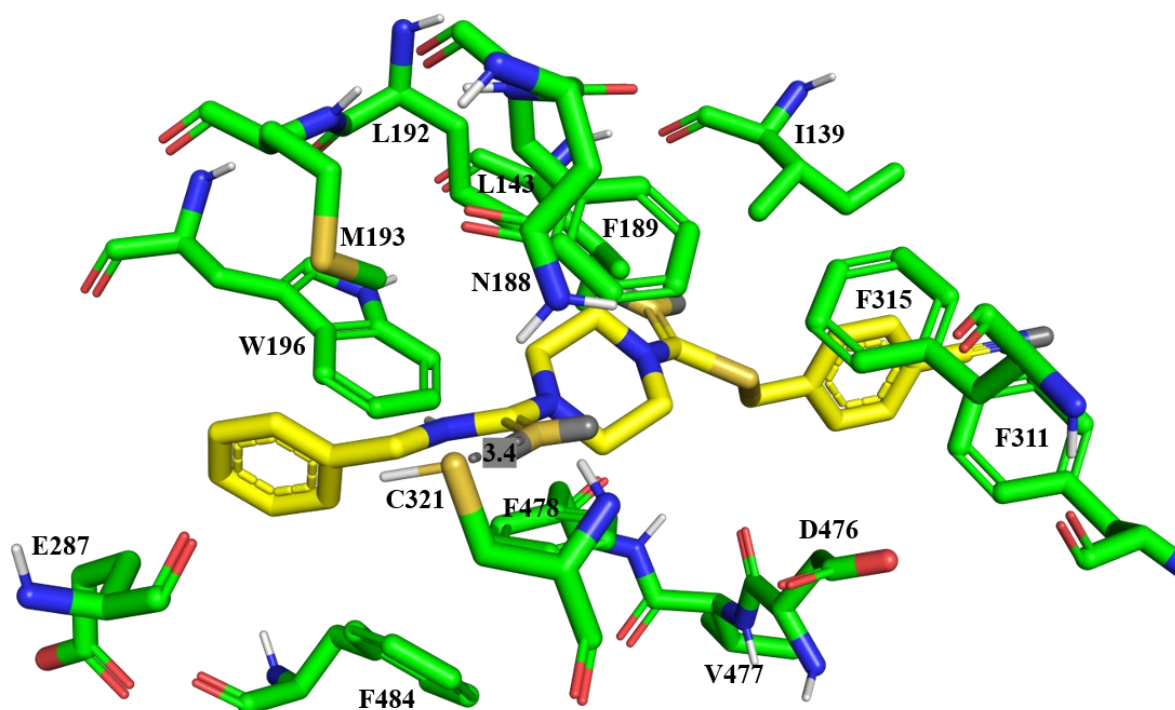
**Abbildung 195:** Dockingpose von **Schl-33.536**, [Interaktionen: 1) des Thiophenrings mit Tryptophan 196; 2) der Sulfonylgruppe mit Cystein 321 über eine H-Brücke, relativer Abstand 3,3 Å; 3) des Cyclohexylmethyl-Restes mit den Phenylalaninen 189/315/311 in Form von hydrophoben Kontakten]

**Schl-33.757** ist mit seinem *para*-Nitrobenzylrest wiederum so orientiert, dass das  $\pi$ -System zu dem von Tryptophan 196, T-förmig angeordnet ist (**Abb. 196**). Die Thiocarbonyl-Gruppe des Dithiocarbamats hat zu Cystein 321 einen relativen Abstand von etwa 4,3 Å. Eine Thiocarbamoylierung durch nucleophilen Angriff des Cysteins am Carbonylkohlenstoff-Atom ist damit denkbar. Der Benzolring am Piperazin-Harnstoff ist zu hydrophoben Wechselwirkungen insbesondere mit Phenylalanin 311 befähigt.



**Abbildung 196:** Dockingpose von **Schl-33.757**, [Interaktionen: 1) des 4-Nitrobenzyl-Restes mit Tryptophan 196, T-förmige Anordnung; 2) der Thiocarbonyl-Gruppe des Dithiocarbamats mit Cystein 321, Carbomylierung denkbar, relativer Abstand 4,3 Å; 3) des Benzol-Restes des Piperazin-Harnstoffs mit Phenylalanin 311]

Auch **Schl-33.567** tritt über den Benzylsubstituenten am Thioharnstoff in Wechselwirkung mit Tryptophan 196 (**Abb. 197**). Über das Schwefelatom des Thioharnstoffs ist zudem die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu Cystein 321 möglich. Der Abstand beträgt hier etwa 3,4 Å. Der *para*-Cyanbenzyl-Rest am Schwefelatom des Dithiocarbamats steht T-förmig zu Phenylalanin 315. Die Dithiocarbamat-Funktion jedoch ist wiederum in keinerlei Wechselwirkung eingebunden und weit von dem katalytisch aktiven Zentrum entfernt.



**Abbildung 197:** Dockingpose von **Schl-33.567**, [Interaktionen: 1) des Benzyl-Restes des Thioharnstoffs mit Tryptophan 196; 2) des Thiocarbonyl-Schwefelatoms vom Thioharnstoff mit Cystein 321 über eine H-Brücke, relativer Abstand 3,4 Å; 3) des 4-Cyanbenzyl-Restes am Dithiocarbamat mit Phenylalanin 315, T-förmige Anordnung]

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die ausgewählten und in die ALDH *gedockten* Dithiocarbamat-Derivate durchaus in die vorgegebene Bindetasche passen. Räumlich gesehen nehmen sie den zur Verfügung stehenden Platz bestmöglich ein und füllen diesen aus. Dadurch wird die Bindung des Substrats an das Zielenzym unterbunden. Jedoch ist der hydrophobe Tunnel, in welchem das aktive Zentrum liegt, sehr schmal, wodurch insbesondere die etwas längeren Liganden-Moleküle aus diesem zunehmend herausragen und sich damit im Lösungsmittel befinden, was eher ungünstig ist. Interaktionen der Liganden sind aufgrund der überwiegend hydrophoben Aminosäure in der Bindungstasche auf wenige hydrophobe Kontakte beschränkt. Wasserstoffbrückenbindungen sind aufgrund der Gestalt des Enzyms kaum möglich. Auffällig ist zudem, dass die Dithiocarbamat-Funktion nahezu aller Dockingposen von dem katalytisch aktiven Cystein abgewandt ist. Die Ausbildung einer

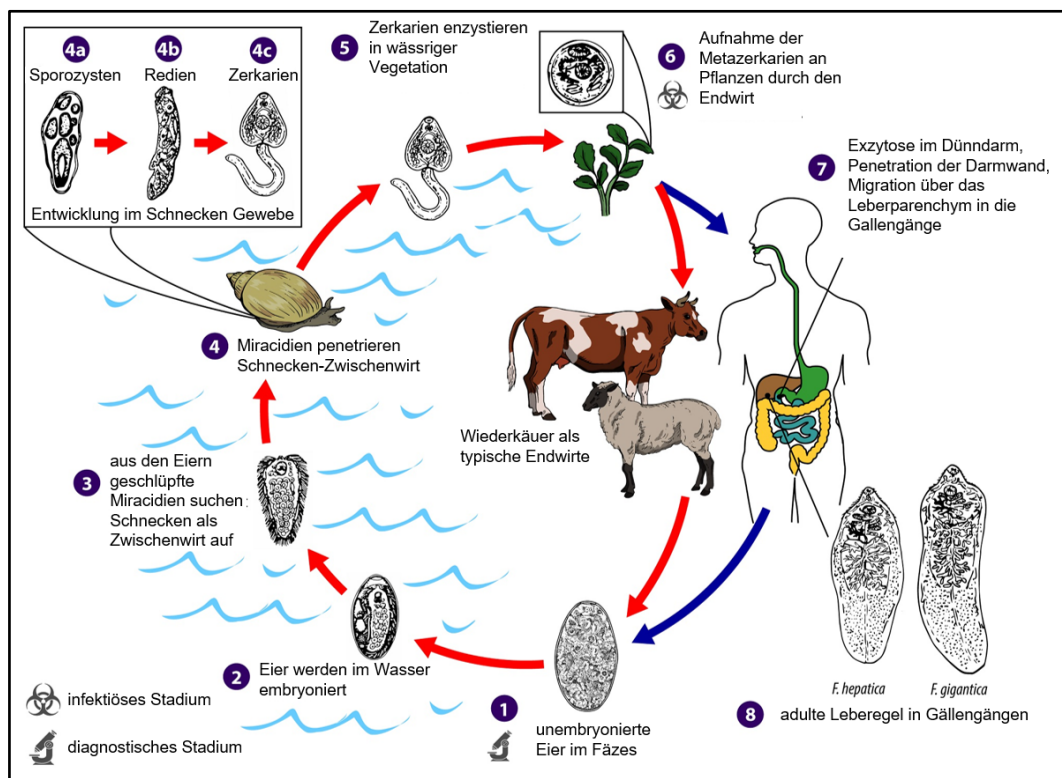
kovalenten Bindung zwischen dem Schwefelatom des Cysteins und dem Carbonylkohlenstoff-Atom der Dithiocarbamat-Funktion im Zuge einer nucleophilen Substitutionsreaktion unter Austritt eines Thiolatanions bleibt damit aus. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu Disulfiram dar. Ein wirklicher Nutzen der Dithiocarbamat-Funktion, die nach den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen nicht zu ersetzen ist, wird nicht deutlich. Generell lassen sich die erarbeiteten SARs anhand des Dockings nur schwer erklären. Vereinzelt lassen sich Strukturfragmente einzelnen Interaktionen zuordnen, allgemein gültige Aussagen können aber nicht getroffen werden. Es wird weder deutlich, warum auf Seiten des einfach gebundenen Schwefelatoms des Dithiocarbamats Benzylsubstituenten mit elektronenziehenden Gruppen in *para*-Position (insbesondere eine Nitrogruppe) von gewisser Notwendigkeit für eine deutlich ausgeprägte antischistosomale Aktivität sind, noch warum vor allem Sulfonyl-Reste (bevorzugt vor Sulfamoyl-Resten und Harnstoffen) am Piperazin-Ring für die Wirkung gegenüber den Schistosomen aktivitätsfördernd sind. Somit ist die ALDH vermutlich weniger wahrscheinlich das Target der Dithiocarbamat-Derivate, wenngleich das Modell nicht den nativen Zustand des Enzyms wiedergibt. Auch bringt das Docking basierend auf einem Homologiemodell anstelle einer aufgelösten Kristallstruktur des gewünschten Zielenzyms schon einen gewissen Fehler mit sich. Grundsätzlich sind damit nur vage Aussagen möglich. Ferner ist eine andere Bindungsstelle innerhalb der ALDH, als die für das *Docking* gewählte, prinzipiell denkbar. Eventuell könnten auch Interaktionen der Dithiocarbamat-Funktion mit einem zentralen Metallion, wie diese beispielsweise auch in der *cofactor-binding-site* zu finden sind, eine entscheidende Rolle spielen.



### 3.13 *In-vitro*-Testung an anderen Helminthen

#### 3.13.1 *In-vitro*-Testung gegen *Fasciola hepatica*

Eine Auswahl von Dithiocarbamat-Derivaten (Tab. 51) wurde zudem auch auf ihr antiparasitäres Potenzial gegen den großen Leberegel *Fasciola hepatica* getestet. Dieser gehört zu den Trematoden und ist vor allem in den höheren Regionen Süd- und Mittelamerikas (vor allem Bolivien und Peru), aber auch in den südlichen ehemaligen Sowjetrepubliken, in Westeuropa (inklusive Deutschland), in Ägypten und im Nahen Osten verbreitet.<sup>[654]</sup> Die flachen, zwittrigen geschlechtsreifen Würmer nisten sich in der Leber genauer in den proximalen Gallengängen von Pflanzenfressern (Herbivoren) meist Ziegen, Schafen und Rindern ein. Dort legen sie Eier ab, die mit dem Kot des Endwirts ausgeschieden werden (Abb. 198).



**Abbildung 198:** Lebenszyklus von *Fasciola hepatica* (überarbeitet nach CDC - Centers for Disease Control and Prevention)<sup>[655]</sup>

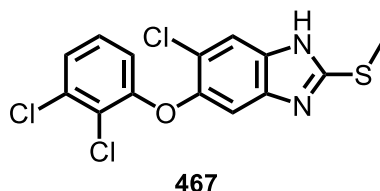
Aus den Eiern schlüpfen wie auch bei den Schistosomen Wimpernlarven (Miracidien), die in eine Schnecke der Gattung *Lymnaea* als Zwischenwirt eindringen. In der Schnecke entwickeln sich die Larven über Sporocysten letztlich zu Schwanzlarven (Zerkarien) weiter. Die Zerkarien verlassen aktiv die Schnecke und verkapseln (enzystieren) sich an Gräsern und anderen Pflanzen als Metazerkarien, die über Monate hinweg infektiös bleiben. Nach Ingestion (Aufnahme über den Mund bzw. Verdauungstrakt) durch den Endwirt verlieren die Larven ihre Zystenform und exzytieren. Sie durchdringen die Darmwand und wandern über die Bauchhöhle ins Leberparenchym. Nach mehreren Wochen befinden sich die



herangewachsenen, juvenilen Würmer dann schließlich in den Gallengängen, wo sie nach sexueller Reifung mit der Eiablage beginnen.<sup>[656]</sup>

Der Mensch kann sich durch den Verzehr von kontaminierten Ufergewächsen oder beim Verzehr roher Leber befallener Tiere infizieren. Der Befall mit dem Leberegel wird Fasciolose genannt und zählt mit etwa 2,6-17,0 Millionen humanen Infektionen zu den NTDs.<sup>[657]</sup> Die Erscheinung und der zeitliche Verlauf der Krankheit hängt stark von der Parasitenzahl ab. Schwere Infektionen können Gallenentzündungen (sklerosierende Cholangitis) und Gallenwegsverschlüsse sowie Bauchspeicheldrüsenentzündungen (Pankreatitis) verursachen.<sup>[658]</sup> Der weltweite ökonomische Verlust durch mit Fasciolose infiziertes Ackervieh und damit an Produktionskapazität (Milch/Fleisch) liegt konservativ geschätzt bei mehr als 3,0 Milliarden Dollar pro Jahr.<sup>[659]</sup>

Zur Behandlung der Fasciolose wird das Wurmmittel Triclabendazol (**467**) eingesetzt. Da jedoch in der Vergangenheit mehrere Berichte eine Resistenzentwicklung von *F. hepatica* gegen Triclabendazol andeuten, ist die Suche nach neuartigen Wirkstoffen unerlässlich.<sup>[660]</sup> Wie auch bei den Schistosomen ist die ALDH in *Fasciola* spp. grundsätzlich als potenzielles Target für eine Wirkstoffentwicklung denkbar.



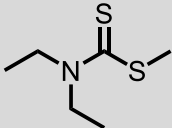
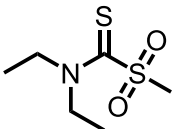
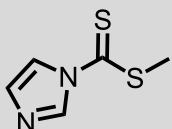
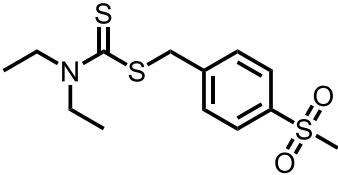
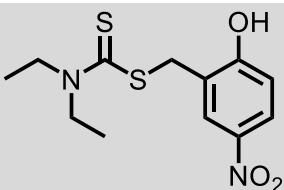
**Abbildung 199:** Strukturformeln von Triclabendazol

In der Arbeitsgruppe GREVELDING wurden zu diesem Zwecke zunächst Disulfiram bei 20  $\mu\text{M}$  durch S. HÄBERLEIN getestet. Nach dreitägiger Kultur hatte es einen letalen Effekt auf exzystierte Juvenile (NEJ, newly excysted juveniles), wohingegen 10  $\mu\text{M}$  nicht aktiv waren. Dies war der Grund, im Weiteren dann auch Disulfiram-Metaboliten bzw. Dithiocarbamat-Derivate, die aus der Arbeit von P. MÄDER stammten, nicht zytotoxisch waren und relativ weit vorne in der Entwicklungslinie der Dithiocarbamate standen (und damit nicht allzu sehr von Disulfiram in der Gestalt abwichen) zu testen.<sup>[286]</sup> Insgesamt waren dies zunächst fünf Dithiocarbamat-Derivate (**Tab. 50**). Die Verbindungen wurden in dieser Arbeit allesamt frisch hergestellt.

Dabei wurde vor allem für **Schl-32.028** eine 10 Mal höhere Aktivität beobachtet: 2  $\mu\text{M}$  waren hier letal, 1  $\mu\text{M}$  reduzierte die Motilität immerhin noch signifikant. Während Disulfiram auf den adulten Leberegel bei der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keinerlei Effekt zeigte, wirkte **Schl-32.028** wiederum letal. Auch bei 50  $\mu\text{M}$  reduzierte es die Motilität noch

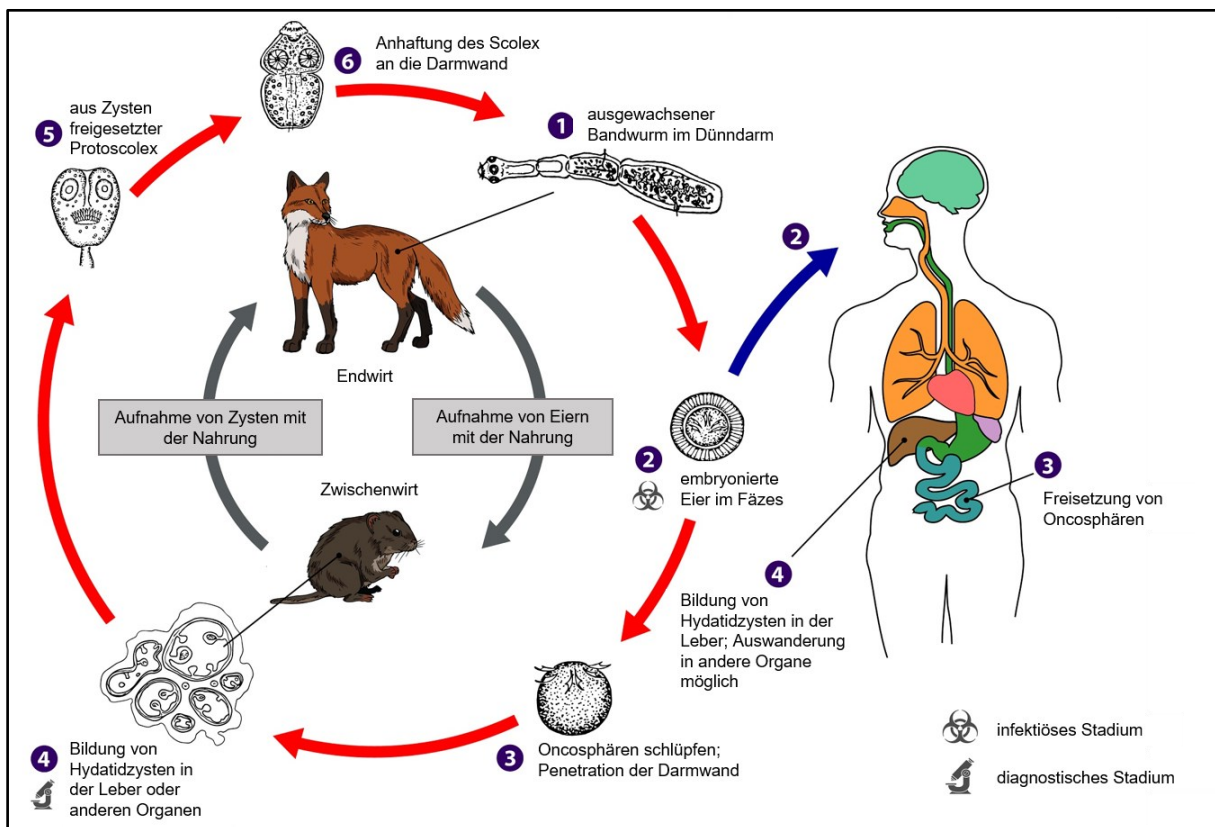
signifikant. Die Ergebnisse der *in-vitro*-Testung wie auch die der Zytotoxizitätsmessung (ab 500  $\mu\text{M}$  zytotoxisch gegenüber HepG2- und LS174T-Zellen) sind mit der von Triclabendazol vergleichbar. Vorläufige Ergebnisse deuten zudem eine Wirksamkeit von weiteren Dithiocarbamat-Derivaten auch späterer Entwicklungslinien mit gleichfalls letalen Effekten, die in dieser Arbeit erstmals entstanden (z.B. **Schl-33.292**), an. Weitere Testungen, darunter eine Vielzahl der aus dieser Arbeit gegenüber *S. mansoni* aktivsten Derivate, werden von S. HÄBERLEIN angestrebt. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Dithiocarbamate auch gegen *Fasciola* antiparasitär wirken.

**Tabelle 51:** Auswahlverbindungen der initialen Testung gegen *Fasciola hepatica*

Strukturformel	Bemerkung	Ausbeute [%]
 <b>Schl-32.008</b>	nicht zytotoxisch bei 100 $\mu\text{M}$ gegen HepG2 und LS174T-Zellen keine Aktivität gegen <i>S. mansoni</i> bei 100 $\mu\text{M}$	94
 <b>Schl-32.023</b>	zytotoxisch bei 100 und 50 $\mu\text{M}$ gegen HepG2-Zellen (darunter, wie auch gegen LS174T nicht getestet) aktiv gegen <i>S. mansoni</i> bei $\geq 50 \mu\text{M}$	34
 <b>Schl-32.028</b>	nicht zytotoxisch bei 100 $\mu\text{M}$ gegen HepG2- und LS174T- Zellen aktiv gegen <i>S. mansoni</i> bei $\geq 5 \mu\text{M}$	69
 <b>Schl-32.118</b>	nicht zytotoxisch bei 25 $\mu\text{M}$ gegen HepG2-Zellen (bei 50 $\mu\text{M}$ zytotoxisch, gegen LS174T nicht getestet) aktiv gegen <i>S. mansoni</i> bei $\geq 10 \mu\text{M}$	68
 <b>Schl-32.158</b>	nicht zytotoxisch bei 25 $\mu\text{M}$ gegen HepG2-Zellen (bei 50 $\mu\text{M}$ zytotoxisch, gegen LS174T nicht getestet) aktiv gegen <i>S. mansoni</i> bei $\geq 5 \mu\text{M}$	70

### 3.13.2 *In-vitro*-Testung gegen *Echinococcus multilocularis*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Auswahl von Testverbindungen (**Tab. 52**) zudem in Kooperation mit dem Arbeitskreis HEMPHILL/LUNDSTRÖM-STADELMANN (Universität Bern, Institut für Parasitologie) gegen den Parasiten *Echinococcus multilocularis* (Fuchsbandwurm) getestet. Dieser kommt vor allem in der nördlichen Hemisphäre vor und verursacht etwa 17.400 humane Infektionen pro Jahr.<sup>[661]</sup> Die Verbindungen entstammen der Arbeit von P. MÄDER und wurden in dieser Arbeit zunächst für weitere Testungen im Multi-Gramm-Maßstab (2-5 g) hergestellt, da sie in der *in-vitro*-Testung an *S. mansoni* vielversprechende Ergebnisse erzielt hatten.<sup>[286]</sup> Die Testungen etwaiger Verbindungen sowie deren *in-vitro*-Testergebnisse gegen *E. multilocularis* werden nachfolgend kurz dargestellt. Der Lebenszyklus des Parasiten ist in **Abbildung 200** gezeigt.



**Abbildung 200:** Lebenszyklus der Echinokokken (überarbeitet nach CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*)<sup>[662]</sup>

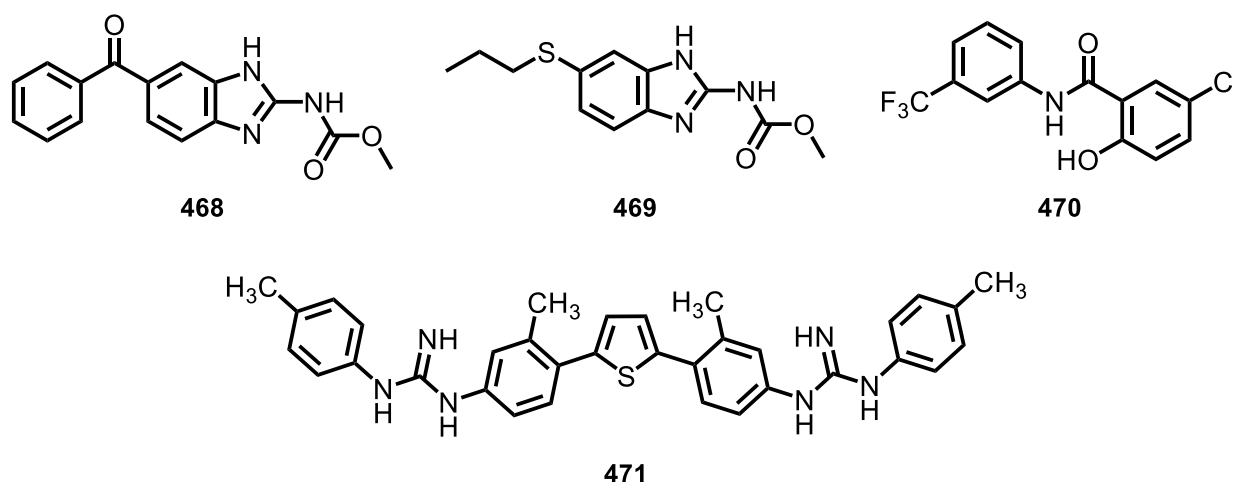
*E. multilocularis* lebt in der Form von adulten Bandwürmern (Cestoden) im Darm von Endwirten. Dies sind hauptsächlich Füchse und andere Caniden. Die adulten Würmer paaren sich dort und bilden tausende von Eiern, die mit dem Kot des Fuchses in die Umwelt gelangen. Die Eier enthalten eine erste Larve die sogenannte Oncosphäre, die schlüpft, wenn ein Zwischenwirt die Eier oral aufnimmt.<sup>[663]</sup> Als Zwischenwirte kommen sowohl Nager, aber eben auch der Menschen als sogenannter Fehlwirt in Frage, bei dem eine Infektion eine alveoläre

Echinokokkose auslösen kann, die unbehandelt zum Tode führt. Das Krankheitsbild entspricht dem eines bösartigen (malignen) Tumors.<sup>[664]</sup> Die Oncosphäre gelangt letztlich durch die Darmwand in die Leber. Dort beginnt sie sich asexuell zu proliferieren und bildet die sogenannte Metazestode, das zweite Larvenstadium, welches immer weiter wächst. Im Menschen endet hier der Zyklus. Im Nager hingegen bilden sich in diesen Metazestoden Brutkapseln mit Kopfanlagen (Protoscolices). Wenn nun ein infizierter Nager von einem Fuchs gefressen wird, werden die Protoscolices aktiviert. Es bilden sich wieder adulte Bandwürmer im Darm. Der Kreislauf kann erneut durchlaufen werden.<sup>[663]</sup>

Benzimidazole wie Mebendazol (**468**) oder Albendazol (**469**) verlangsamen das Wachstum des Erregers, indem sie die Tubulin-Polymerisation im Darm der Würmer hemmen, was zu einer Unterbrechung der Glucoseaufnahme und anderer verdauungsfördernder Funktionen führt.<sup>[665]</sup> Da die Benzimidazole jedoch nur parasitostatische Wirkung haben und nicht zum Absterben des Erregers führen, müssen genannte Medikamente zeitlebens eingenommen werden. Dies wiederum hat schwerwiegende Nebenwirkungen zur Folge. Neue therapeutische Ansätze sind somit dringend erforderlich.<sup>[666]</sup>

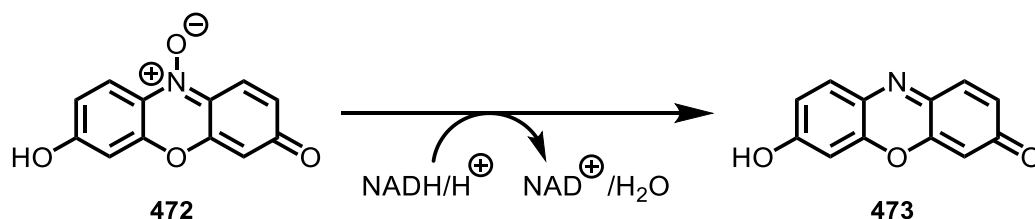
Die zu testenden Verbindungen wurden zunächst gegen adulte Bandwürmer, genauer gegen Echinokokken-Protoscolices, mittels *movement*-Analyse getestet. Vereinfacht bedeutet dies, je weniger sich ein Protoscolex bewegt, desto besser aktiv war eine Testsubstanz. In diesem Test fand Praziquantel als interne Kontrolle, Verwendung. Keine der getesteten Substanzen zeigte jedoch gute Aktivität hinsichtlich Protoscolex-Motilität. PZQ hingegen war wie erwartet aktiv ( $24,16 \pm 2,2\%$  relative Beweglichkeit normiert auf die DMSO-Kontrolle).

Im Weiteren wurden die Auswahlverbindungen dann zudem noch gegen Metazestoden-Vesikel im sogenannten PGI-Assay (Phosphoglucose Isomerase) getestet.<sup>[667]</sup> Metazestoden sind eine Art flüssigkeitsgefüllter Vesikel. PGI ist ein häufig auftretendes Enzym in der Flüssigkeit. Sofern eine Substanz diese Vesikel beeinträchtigt und es zum Austritt von Flüssigkeit kommt, lässt sich damit anhand der Messung von PGI bestimmen. Als interne Kontrolle diente dabei MMV665807 ( $EC_{50} = 1,20 \pm 1,60 \mu\text{M}$ ) und DB1127 ( $EC_{50} = 6,10 \mu\text{M}$ ; **Abb. 201**).<sup>[668,669]</sup> PZQ wirkt nicht gegen die Metazestoden, auch nicht *in vitro*. Benzimidazole wirken *in vitro* wie auch *in vivo* nur langsam.



**Abbildung 201:** Strukturformeln von Mebendazol (**468**), Albendazol (**469**), MMV665807 (**470**) und DB1127 (**471**)

Mittels *alarmaBlue*-Test wurde im nächsten Schritt dann überprüft, ob die Zellen in den Metazestoden tatsächlich auch tot waren. Ein großes Problem der Therapie der Krankheit liegt nämlich darin, dass in den Metazestoden viele verschiedene Zellen, auch Stammzellen wachsen. Diese stellen, sofern sie nicht abgetötet werden, immer wieder Grundlage für das Wachstum der Parasiten dar.<sup>[670]</sup> Für die Messung wurde der blaue Redoxfarbstoff Resazurin (**472**) eingesetzt. Dieser wird durch lebende Zellen irreversibel zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin (**473**) reduziert (**Schema 98**).<sup>[671]</sup> Durch Fluoreszenzmessung lässt sich die Zellviabilität letztlich abbilden.



**Schema 98:** Reduktion von Resazurin zu Resorufin

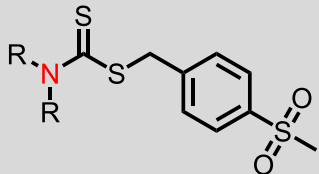

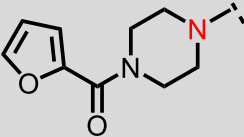
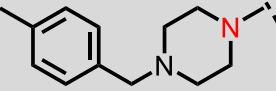
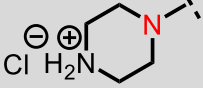
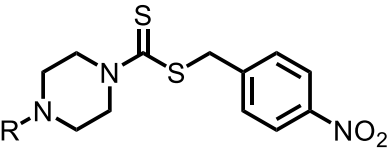
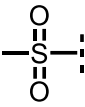
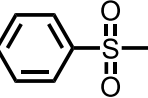
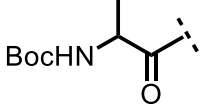
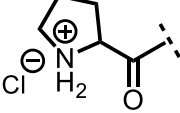
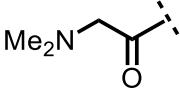
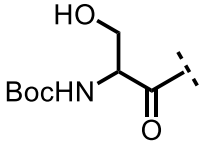
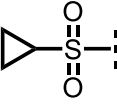
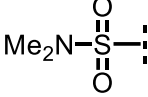
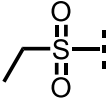
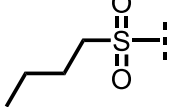
Während Disulfiram in einem initialen *Screen* keine Wirkung zeigte, waren die Verbindungen **Schl-32.294**, **Schl-32.315** und **Schl-32.354** im PGI-Assay aktiv. **Schl-32.294** und **Schl-32.315** zeigten dann tatsächlich auch noch im *alarmaBlue*-Test Aktivität. **Schl-32.354** erwies sich hingegen als falsch positiv. Nach weiteren Konzentrationsvariationen wurden folgende  $\text{EC}_{50}$ -Werte erhalten. Dabei wurde zwischen einer 5-tägigen und 12-tägigen Inkubationszeit unterschieden:

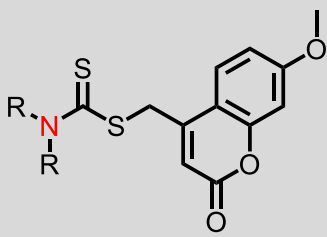

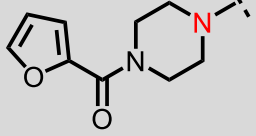
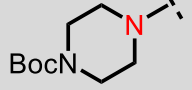
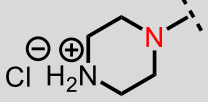
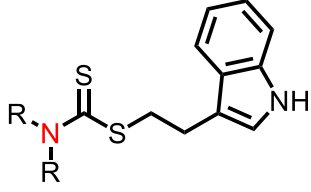

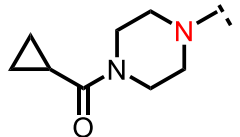
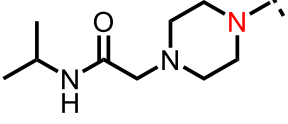
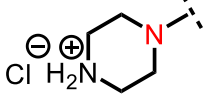
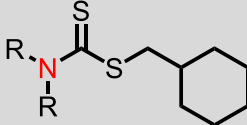
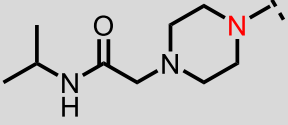
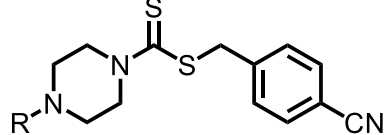
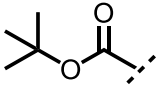
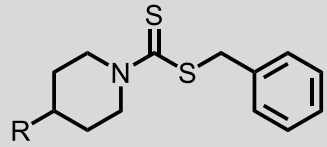
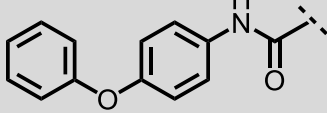
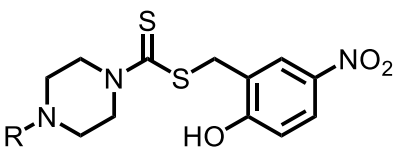
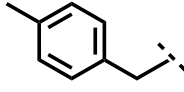
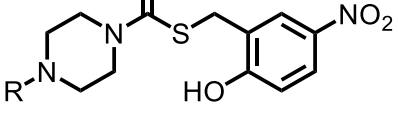
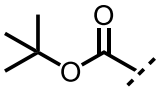
**Schl-32.294:**  $\text{EC}_{50} = 2,54 \mu\text{M}$  (5 Tage);  $\text{EC}_{50} = 2,66 \mu\text{M}$  (12 Tage)

**Schl-32.315:**  $\text{EC}_{50} = 4,10 \mu\text{M}$  (5 Tage);  $\text{EC}_{50} = 5,25 \mu\text{M}$  (12 Tage)

**Schl-32.294** und **Schl-32.315** sind damit aktiv gegen Metazestoden Vesikel von *E. multilocularis* und können bei höheren Konzentrationen ( $c > 10 \mu\text{M}$ ) auch die Zellen in Metazestoden abtöten. Die Aktivität ist mit der der Positivkontrolle in etwa vergleichbar. Auffällig war, dass von den siebenundzwanzig getesteten Dithiocarbamat-Derivaten, die strukturell ziemlich unterschiedlich waren, nur diejenigen Verbindungen mit einem 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest aktiv waren (rot umrandete Verbindungen in **Tab. 51**). Dies legt den Verdacht nahe, dass es sich hierbei womöglich um den Teil eines Pharmakophors und damit ein molekulares Muster handelt, das die biologische Aktivität trägt. Um jener Frage nachzugehen, werden weitere Substanzen, die diesen Rest tragen und in dieser Arbeit und der von P. MÄDER entstanden, derzeit auf ihr parasitizides Potential an *E. multilocularis* getestet.

**Tabelle 52:** Auswahlverbindungen der Testung gegen *E. multilocularis* (\* Ausbeute über mehrer Stufen berechnet)

Strukturformel	Schl.-32.	R =	Ausbeute [%]
	...118		68
	...278		63
	...292		62
	...320		95*
	...329		77
	...330		78*
	...337		84*
	...347		70*
	...351		49*
	...354		37*
	...360		57*
	...361		54*
	...363		63*
	...364		66*

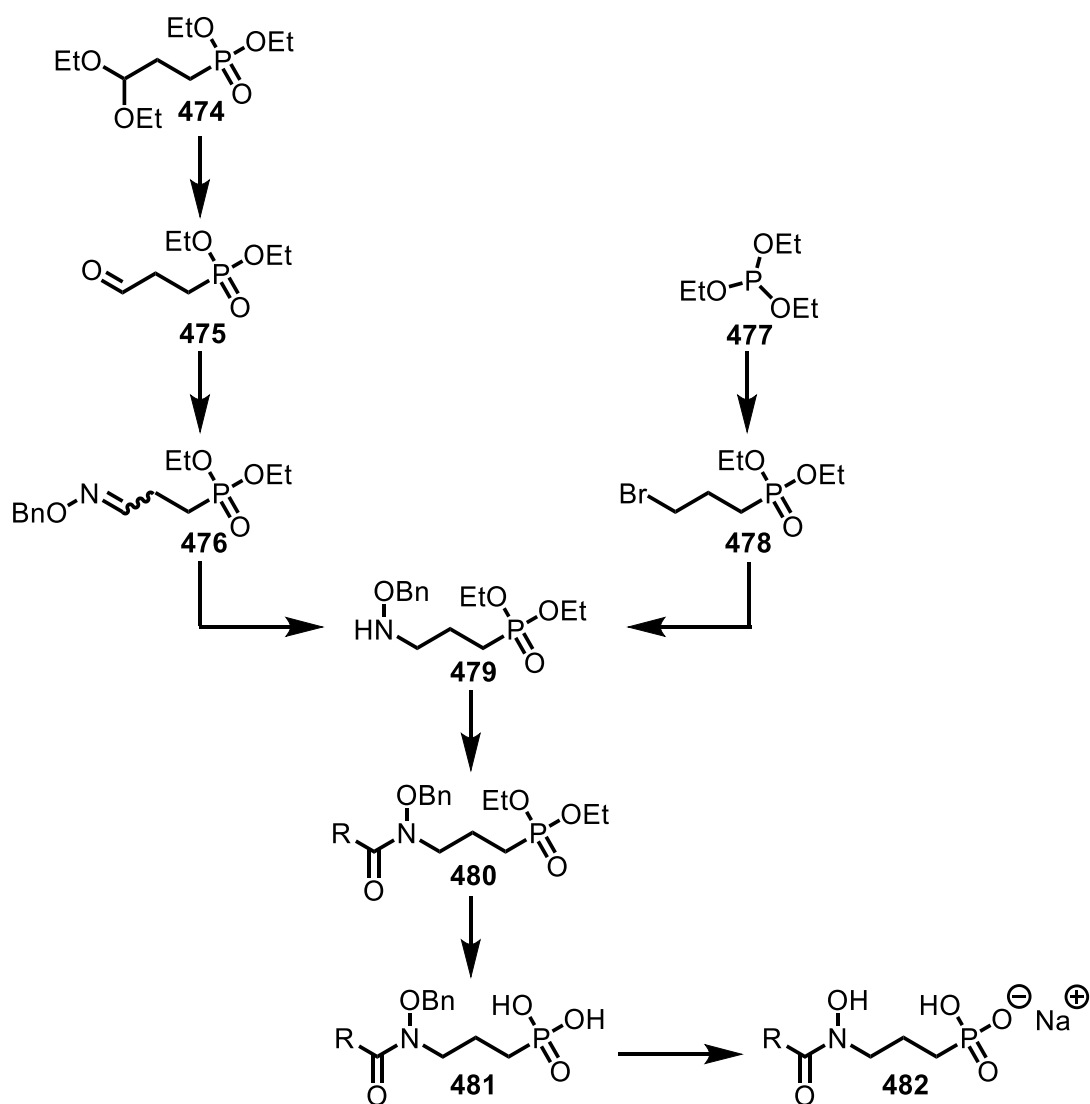
Strukturformel	Schl-32.	R =	Ausbeute [%]
	...175		95
	...282		43
	...317		79
	...324		82*
	...189		90
	...304		60
	...311		75
	...325		91*
	...309		90
	...314		75
	...177		26*
	...294		52
	...315		44



### 3.14 Weitergehende Stoffklassen mit antischistosomalem Potenzial?

#### Fosmidomycin-Derivate

Im Zuge dieser Arbeit wurden neben den Dithiocarbamaten weitere Stoffklassen auf ihre antischistosomale Wirksamkeit getestet, die hier ebenfalls kurz beleuchtet werden sollen. So wurden für die Arbeitsgruppe HOFFMANN (ABERYSTWYTH University, Wales) Fosmidomycin-Derivate erneut dargestellt, deren Synthese in vorhergehender Masterarbeit bereits beschrieben wurde. Die Endverbindungen wurden dafür ausgehend von (3-Benzyl oxyaminopropyl)-phosphonsäurediethylester (**479**) in drei Stufen dargestellt (**Abb. 202**). Diese umfassen neben der Acylierung, die Phosphonsäureesterspaltung und die Benzylhydroxylamin-Entschützung. Die Verbindungen **482** wurden als Natriumsalze ausgefällt.



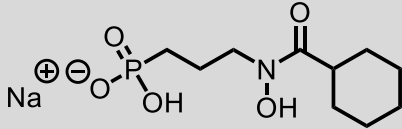
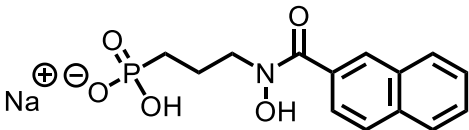
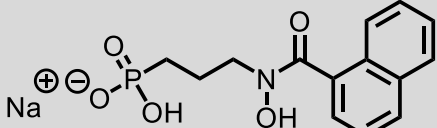
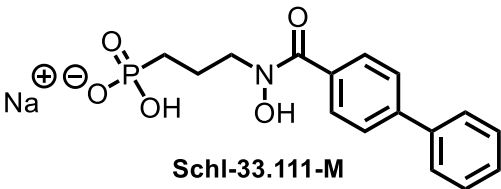
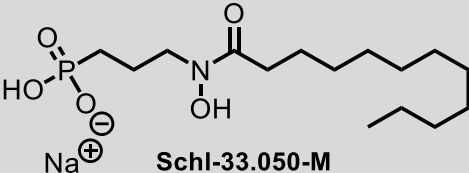
**Abbildung 202:** Syntheseroute zur Darstellung von Fosmidomycin-Derivaten.

Das Benzyl-geschützte Hydroxylamin **479** wiederum wurde aus (3,3-Diethoxypropyl)-phosphonsäurediethylester (**474**) erhalten, wobei zunächst eine säurekatalysierte Acetalspaltung vorgenommen wurde. Der resultierende Aldehyd **475** wurde in einer

Kondensationsreaktion zum Oxim **476** und schließlich durch Reduktion zum Hydroxylamin **479** umgesetzt. Auch wurde das Hydroxylamin **479** in einer zweistufigen Synthesesequenz aus Triethylphosphit (**477**) in einer *Arbuzov*-Reaktion und darauffolgender nucleophiler Substitution an **478** hergestellt.

Neben einem Cyclohexyl-Rest wurden ein Undecanyl-, ein 1- und ein 2-Naphthyl-Rest sowie ein 4-Biphenyl-Rest eingeführt (**Tab. 53**). Jene Derivate hatten sich *in vitro* als potente Inhibitoren der humanen Lysin-spezifischen Histon-Demethylase 4A mit JMjC-Domäne erwiesen. Womöglich bindet das Fosmidomycin über seine Hydroxamsäure-Funktion an das im aktiven Zentrum der Histon-Demethylase (HDM) befindliche Fe(II) und verdrängt dabei den für die katalytische Aktivität des Enzyms unerlässlichen Cofaktor  $\alpha$ -Ketoglutarat.

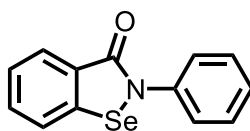
**Tabelle 53:** Strukturformeln der an Schistosomula getesteten Fosmidomycin-Derivate (Ausbeuten allesamt über mehrere Stufen)

Strukturformel	Ausbeute [%]
 <p>Schl-33.166-M</p>	64
 <p>Schl-33.081-M</p>	34
 <p>Schl-33.115-M</p>	14
 <p>Schl-33.111-M</p>	19
 <p>Schl-33.050-M</p>	24

Auch Schistosomen verfügen über Histon-modifizierende Enzyme. Neben Histon-Deacetylasen, die in jüngerer Vergangenheit (wie in der Einleitung beschrieben wurde) als potenzielle Targets zur Entwicklung von neuartigen antischistosomalen Wirkstoffen auserkoren wurden, sind darunter auch Histon-Demethylasen. So sind 14 HDMs in *S. mansoni* bekannt, von denen 11 eine JMjC-Domäne besitzen.<sup>[672]</sup> Da sich alle Oxygenasen mit diesem Motiv innerhalb ihrer katalytischen Kernregion insbesondere hinsichtlich des Bindungsmusters der Cosubstrate ähneln, lag eine Wirksamkeit auch gegenüber schistosomalen Histon-Demethylasen nahe. Die Inhibition sollte demnach zu einem antischistosomalen Effekt führen, weshalb eine initiale Testung der synthetisierten Verbindungen an Schistosomula vorgenommen wurde. Jedoch konnte nach 72 h weder bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  noch von 50  $\mu\text{M}$  eine Wirkung beobachtet werden. Weitere Verbindungen wurden nicht getestet.

### Ebselen

Eine andere Art potenter Inhibitoren der Unterfamilie der humanen Lysin-Demethylasen fanden SCHOFIELD *et al.*, die unter anderem auch organische Selenverbindungen wie Ebselen (**483**) an der Lysin-spezifischen Demethylase JMJD2A (Synonym für KDM4A) testeten.<sup>[673]</sup> Histon-Demethylasen vom Typ JMJD2A besitzen in unmittelbarer Nähe zur Bindestelle des zu demethylierenden Methyllysins als einzige der Histon-Demethylasen eine Cystein-Histidin-Zn(II)-Bindestelle mit jedoch bislang unbekannter Funktion. Es wurde angenommen, dass durch Verdrängung des  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions ebenfalls eine Inhibition der HDM erreicht werden könnte, die zugleich selektiv wäre. Dieser Effekt trat *in vitro* dann tatsächlich auch ein. Da neben den Organoselenverbindungen auch Disulfiram-Derivate hinsichtlich HDM-Inhibition untersucht wurden und wirksam waren, sollte Ebselen nun zunächst auch gegenüber den Schistosomen getestet werden. Im Falle einer Wirksamkeit des Ebselens sollten somit eventuell Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus und ein mögliches Target der Dithiocarbamat-Derivate zu ziehen sein, da dieses immer noch nicht geklärt ist.



**483**

**Abbildung 203:** Strukturformel von Ebselen

Ebselen wurde hierzu initial bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  getestet. Während es bei 25  $\mu\text{M}$  unwirksam war, führte es bei 50  $\mu\text{M}$  bereits innerhalb der ersten 24 h der Testung zu einer vollständigen Reduktion der Eiproduktion, 80%-iger Entpaarung und einem Rückgang der Motilität von etwa 50%. Nach insgesamt 72 h waren alle Paare getrennt

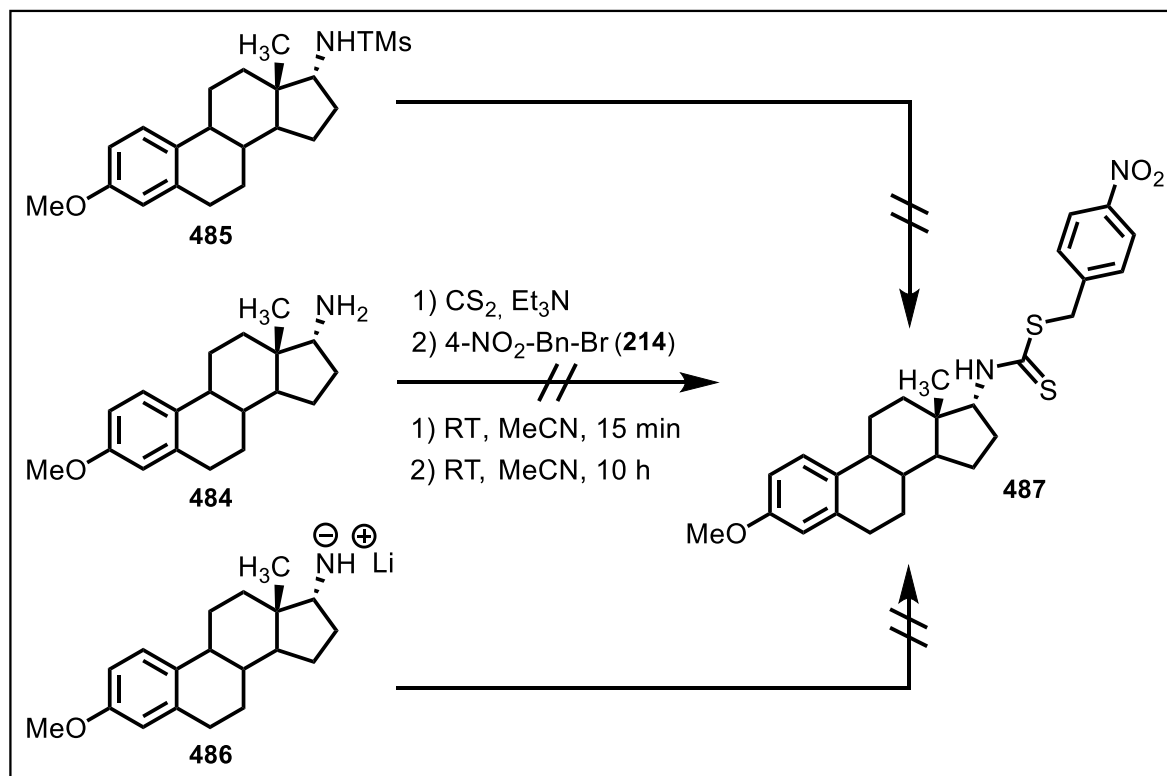
und die Motilität auf 32% zurückgegangen. Weiterhin traten massive Tegumentschäden in Form von Tegumentablösungen und der Verlust innerer Struktur auf. Vereinzelt kam es auch zur Blasenbildung. Die Würmer waren zudem allesamt tief-dunkel gefärbt. Bei 100  $\mu\text{M}$  war die Paarungsstabilität und Eiproduktion bereits nach 24 h gänzlich gestört und auch die Motilität nur noch auf minimale Bewegungen beschränkt. Auch Tegumentschäden waren nach 24 h schon überaus deutlich ausgeprägt. Nach 72 h waren dann mehr als die Hälfte aller Würmer tot.

Die Phänotypen, welche das Ebselen verursachte, unterscheiden sich von denen der Dithiocarbamat-Derivate, die zumeist Darmdilatationen der Weibchen bewirkten. Dies legt die Vermutung nahe (setzt man ein einziges Target aller Dithiocarbamat-Derivate voraus), dass das Ebselen und die Dithiocarbamate unterschiedliche Targets adressieren. Der genaue Wirkort ist jedoch in beiden Fällen weiterhin unbekannt. Nichtsdestotrotz wurde die gute Wirksamkeit des initial getesteten Ebselens im Arbeitskreis zum Anlass genommen, weitere Derivate zu synthetisieren.

### Arylmethylamino-Steroide

Eine weitere Strategie, die in dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe KRIEG (Jena) verfolgt wurde, war die Verknüpfung des Dithiocarbamat-Gerüsts mit einem hydrophoben Steroid-Gerüst (**487**). Die Idee war, ein Arylmethylamino-Steroid (AAS) als Carrier zu nutzen, das dann über einen spezifischen Rezeptor oder aber Endozytose in den Wurm aufgenommen wird. Entsprechende Ansätze von derartigen Hybriden mit antimikrobieller Wirkung sind bekannt. So zeigen einige dieser Verbindungen bei einer mit PZQ vergleichbaren Konzentrationen dramatische Effekte hinsichtlich der Morphologie, Physiologie und der Vitalität von adulten Schistosomen *in vitro*.<sup>[674]</sup> Ein erster Versuch, das Steroid **484** direkt über die Aminogruppe in das Dithiocarbamat-Funktion einzubinden, scheiterte jedoch womöglich auch an der geringeren Nucleophilie des primären Amins und damit der verminderten Reaktivität gegenüber den sonst für die Synthese verwendeten sekundären Aminen (**Schema 99**). So wurde im Verlauf dieser Arbeit mehrfach die Beobachtung gemacht, dass sich primäre Amine nur schwer mit Kohlenstoffdisulfid zum entsprechenden Dithiocarbamat umsetzen ließen. Diesem Umstand wurde im Weiteren dann mit der Silylierung des Amins begegnet (**485**). Das Amin wurde dazu mit Trimethylchlorsilan und äquimolaren Mengen an Triethylamin zunächst in das entsprechende *N*-Trimethylsilylamin-Derivat überführt, dass dann jedoch ebenso wenig zum Dithiocarbamat-Derivat abreagierte. Auch wurde versucht, die Aminogruppe mit *n*-Butyllithium ( $\text{pK}_\text{s} = 50$ ) bei tiefen Temperaturen zu

deprotonieren (**486**). Die darauffolgende Substitution missglückte aber ebenfalls. Weitere Reaktionen wurden an dieser Stelle nicht durchgeführt.

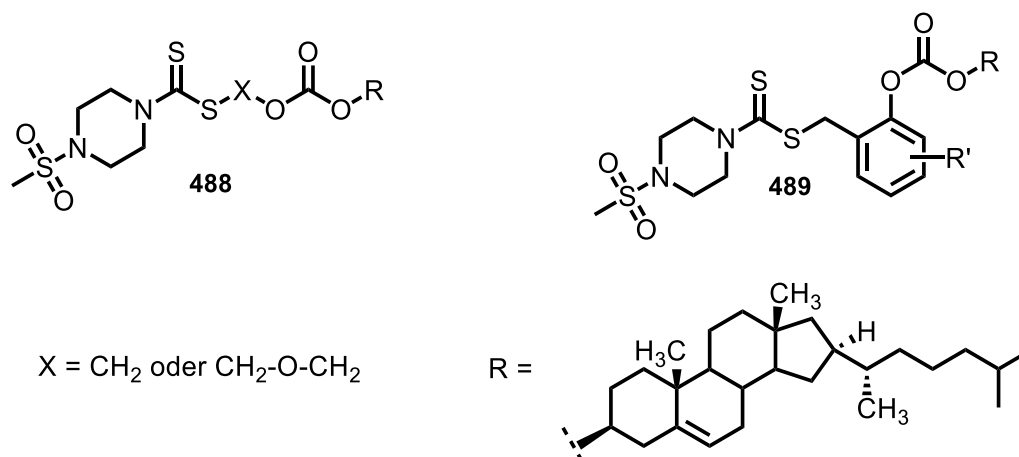


**Schema 99:** Gescheiterte Versuche der Hybridisierung der Dithiocarbamat-Funktion mit einem Amino-Steroid

Für weitere Arbeiten wäre die Verknüpfung über das einfach gebundene Schwefelatom des Dithiocarbamats in Form eines Kohlensäureesterprodrugs wie **488** oder **489** zu empfehlen (**Abb. 204**). Eine derartige Verknüpfung hätte den Vorteil, dass *in situ* Dithiocarbamat-Anionen entstehen würden, die sofern die Wirkung der antischistosomal aktiven Dithiocarbamat-Derivate auf der Wechselwirkung/Komplexbildung mit Metallen beruht, den eigentlichen Pharmakophor generieren. Weiterhin bliebe die Aminogruppe der Dithiocarbamat-Funktion, in diesem Fall das Piperazin unberührt, das ebenfalls sensibel die gefundene Aktivität beeinflusst und als Teil eines Pharmakophors in Frage kommt. Jene Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass Piperazin-Derivate als Anti-Wurmmittel bekannt sind.<sup>[675]</sup> Auch eine Hybridisierung über einen 2-Hydroxybenzyl-Rest ist denkbar. Dieser könnte in Analogie zu den literaturbekannten antischistosomal aktiven AAS-Derivaten ebenfalls als Austrittsgruppe fungieren und ein Chinon-Methid bilden, das dann wiederum mit biologischen Nucleophilen reagiert. Auch für die Nitro-Gruppe wurde jener Wirkmechanismus postuliert. Synergetische Effekte sind über jene Art der Verknüpfung damit also möglich.

Um der Frage der Wirksamkeit von etwaigen Dithiocarbamat-Hybriden nachzugehen, sollte in Folgearbeiten anstelle eines 17-Aminoestratrien-Derivats zunächst ein Cholestan-Derivat synthetisiert werden. Cholestan-Derivate sind ebenfalls deutlich antimikrobiell aktiv. Das

Cholestan-Gerüst ist jedoch kommerziell in größeren Mengen als Cholesterolchloroformiat erhältlich und sollte damit einen guten Zugang zu den Prodrugestern bieten.



**Abbildung 204:** Steroid-basiertes „Träger“-Konzept der Dithiocarbamat-Derivate

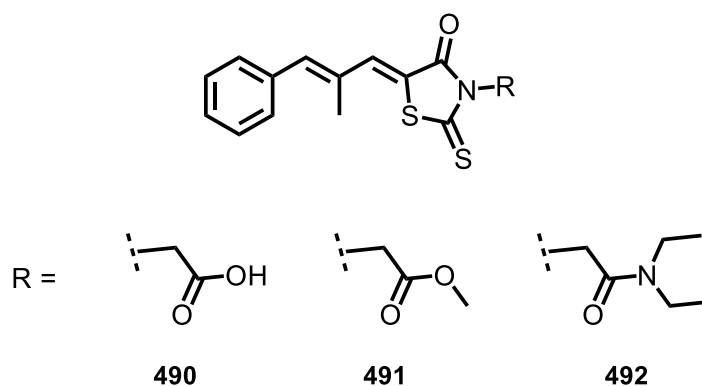
### Epalrestat

Neben den Aldehyd-Reduktasen besitzen die Schistosomen weitere Oxido-Reduktasen wie etwa Aldose-Reduktasen. Aldose-Reduktasen (AR) spielen vermutlich neben zahlreichen anderen Redox-assoziierten Proteinen eine wichtige Rolle bei der antioxidativen Abwehr zur Bewältigung von Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS).<sup>[676,677]</sup> Überdies ist bekannt, dass AR am Steroidstoffwechsel, der Energieversorgung, Zellproliferation, Apoptose und an Alterungsprozessen beteiligt sind.<sup>[678–680]</sup> Die Vielfältigkeit der Aufgaben lässt vermuten, dass die Aldose-Reduktasen Schlüsselenzyme in den Schistosomen darstellen, was diese zu einem attraktiven Wirkstoff-Target macht. In dieser Arbeit sollte daher das *in-vitro*-Potential des humanen Aldose-Reduktase-Inhibitors Epalrestat (**490**) gegen adulte Schistosomen untersucht werden. Dadurch sollte möglicherweise ein weiterer Ansatzpunkt (neben der im Arbeitskreis SCHLITZER bereits bearbeiteten Stoffklasse der Biarylalkylcarbonsäuren) für eine Wirkstoffentwicklung gefunden werden.<sup>[681,682]</sup>

Epalrestat (**490**) wurde dabei auch als Methylester- (**491**) und *N,N*-Diethylamid-Derivat (**492**) bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  getestet. Während Epalrestat selbst bei 100  $\mu\text{M}$  inaktiv war, zeigte das Methylester-Derivat **491** bei 50  $\mu\text{M}$  bereits nach 24 h einen annähernd vollständigen Rückgang der Eiproduktion. Nach 72 h waren 50% aller Würmer entpaart und die Motilität um etwa 25% zurückgegangen. Bei 100  $\mu\text{M}$  wurde über 72 h hinweg eine Reduktion der Motilität von 40% erreicht. Zudem wurde die Paarungsstabilität um 70% vermindert. Das *N,N*-Diethylamid-Derivat **492** hingegen wirkte auch bis 25  $\mu\text{M}$  deutlich. Innerhalb von 72 h reduzierte **492** die Anzahl von Paaren annähernd vollständig. Auch die Eiproduktion kam zum Erliegen. Zudem ging die Motilität der Schistosomen um die Hälfte

zurück. Starke Tegumentschäden traten nach bereits 24 h und etwas schwächere Darmdilatationen dann nach 48 h auf. Letale Effekte wurden jedoch selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nicht beobachtet.

Als Folge der guten Wirksamkeit des *N,N*-Diethylamid-Derivats wird die Umsetzung von Epalrestat mit weiteren Aminen derzeit im Arbeitskreis hinsichtlich ihrer antischistosomalen Aktivität untersucht. Da die Carboxylgruppe für die Wirkung an der humanen AR essentiell ist (vgl. Tolrestat, Ponolrestat, Zenarestat, Zopolrestat), lässt die Wirksamkeit der Amide allerdings auf andere Zielstrukturen schließen.<sup>[683]</sup>



**Abbildung 205:** Strukturformel von Epalrestat (489) und der untersuchten Derivate

## 4 Zusammenfassung

Schistosomiasis ist eine vernachlässigte Tropenerkrankung mit mehr als 200 Millionen Neuinfektionen pro Jahr. Sie wird durch Parasiten der Gattung *Schistosoma* ausgelöst und kann unbehandelt zum Tode führen. Derzeit stehen mit Praziquantel und in eingeschränktem Maße auch mit Oxamniquin lediglich zwei Wirkstoffe zur Bekämpfung der Schistosomiasis zur Verfügung. Der intensive Einsatz dieser beiden Präparate führt jedoch zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Resistenzen. Erste Anzeichen dafür konnten bereits beobachtet werden, sodass die Suche und gezielte Entwicklung neuartiger Wirkstoffe unumgänglich ist.

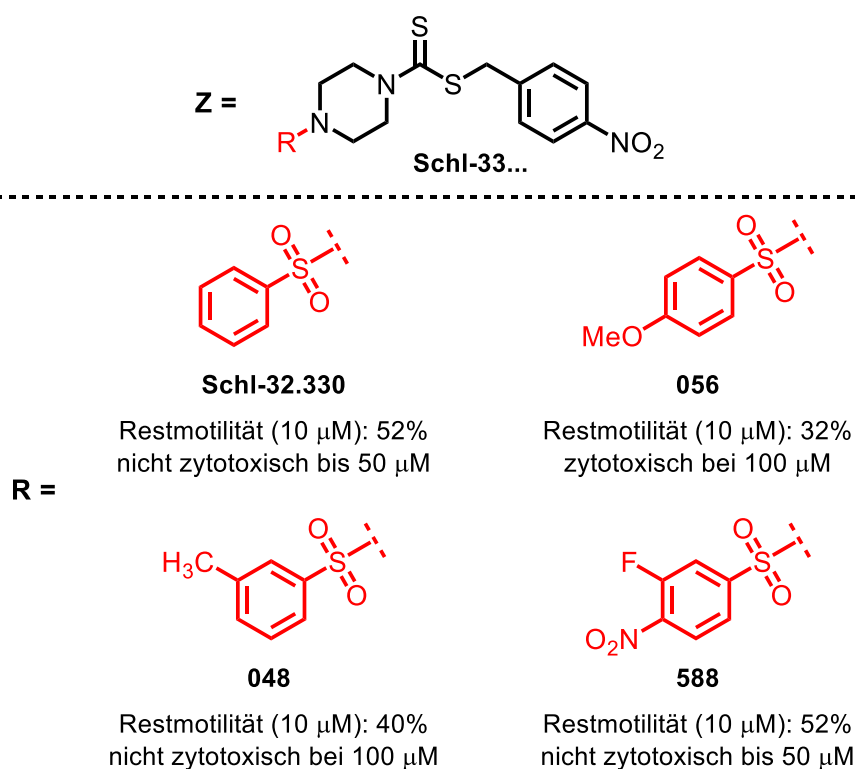
Ziel dieser Arbeit war, die von P. MÄDER gefundene antischistosomale Aktivität der Substanzklasse der Dithiocarbamat-Derivate als potenzielle Wirkstoffe weiterzuentwickeln. Diese basierte auf der Grundstruktur des humanen Aldehyd-Dehydrogenase-Inhibitors Disulfiram und dessen Metaboliten. Die ALDH war im Arbeitskreis GREVELDING als mögliches *drug target* identifiziert worden, woraufhin erste Experimente mit Disulfiram bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt wurden. Dabei zeigte Disulfiram eine gute antischistosomale Aktivität verbunden mit zum Teil morphologischen Veränderungen wie beispielsweise Tegumentschäden. Aufgrund des stark zytotoxischen Potenzials bereits ab Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  ist Disulfiram als antischistosomaler Wirkstoff aber ungeeignet. Aus demselben Grund ist beispielsweise auch dessen Anwendung als Arzneistoff zur Unterstützung der Abstinenz bei Alkoholabhängigkeit (zumindest in Deutschland) nicht mehr zugelassen. Somit galt es, die Aktivität gegenüber Schistosomen zu steigern. Die Dithiocarbamat-Derivate sollten idealerweise eine in Bezug auf die Referenzverbindung Praziquantel bessere oder zumindest vergleichbare antischistosomale Aktivität zeigen bei einer Konzentration von 1-5  $\mu\text{M}$  *in vitro*. Ferner sollten die Derivate ein geringes zytotoxisches Potential aufweisen, das heißt, erst bei Konzentrationen von  $\geq 100 \mu\text{M}$  toxisch zu sein.

### **Piperazin-Sulfonamid-Derivate**

In der Arbeit von P. MÄDER hatten sich vorwiegend elektronenziehende Gruppen wie ein *para*-Nitrobenzyl-Rest auf Seiten des einfach gebundenen Schwefelatoms des Dithiocarbamats als wirksam erwiesen. Dieser Rest wurde zunächst beibehalten. Auf Seiten des Stickstoffatoms des Dithiocarbamats erwies sich der Austausch der Alkylaminogruppe gegen einen Sulfonylpiperazinyl-Rest als besonders günstig. Daher sollten Sulfonamid-Derivate als **primäre Entwicklungslinie** betrachtet werden. Außer der Synthese entsprechender Derivate wurde auch die *in-vitro*-Testung an adulten *S. mansoni* im Arbeitskreis GREVELDING eigenständig durchgeführt und Strukturwirkungsbeziehungen erarbeitet.

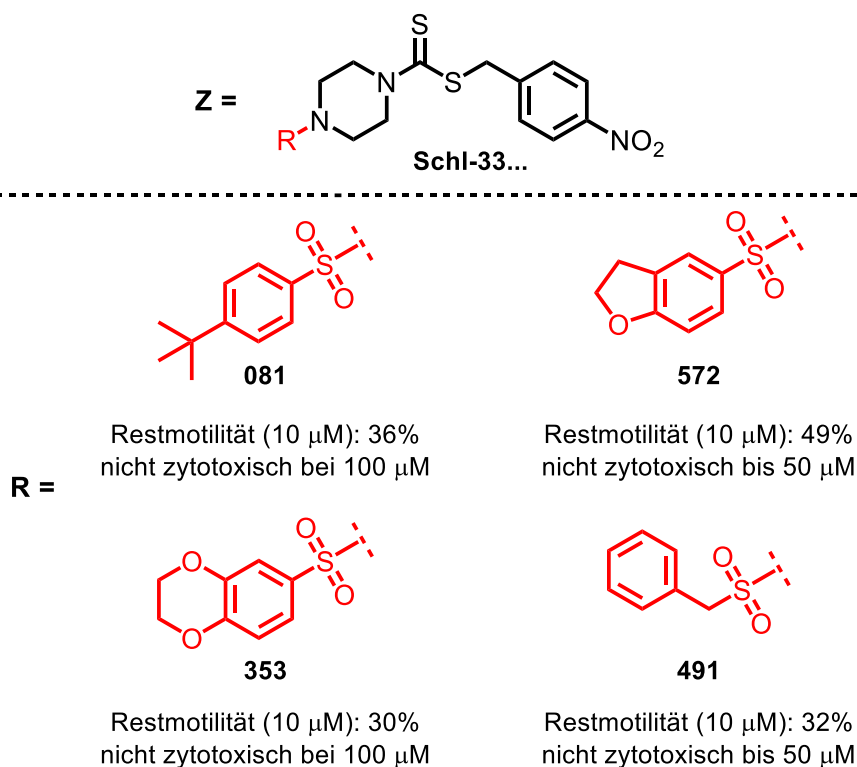


Begonnen wurde dabei zunächst mit einer umfassenden Strukturvariation eines Phenylrestes (**Schl-32.330**), der mit elektronenziehenden und elektronenschiebenden Gruppen in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position versehen wurde. Basierend auf insgesamt neununddreißig Verbindungen, die bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet wurden, ist festzustellen, dass vorwiegend die *para*-Position zur Derivatisierung hinsichtlich der Wirkung geeignet erscheint, wohingegen Substitutionen in der *ortho*-Position zu keinerlei aktiven Verbindungen führten. Weiterhin zeigte sich, dass eine gewisse Größe der Substituenten erforderlich ist und insbesondere Verbindungen mit stark elektronenziehenden Substituenten am wenigsten aktiv waren. Auch H-Brücken-Donor-Eigenschaften scheinen für eine Wirksamkeit keine Rolle zu spielen. Die Derivatisierung führte im Vergleich zum unsubstituierten Benzolsulfonamid-Derivat zumeist zu aktiveren Verbindungen. Das aktivste Derivat (**Schl-33.056**) war dabei mit einer Methoxygruppe substituiert. Weniger zelltoxisch waren jedoch die *meta*-substituierten Derivate wie etwa das Methyl-substituierte Derivat **Schl-33.048**, die gegenüber den Schistosomen allerdings weniger aktiv waren. Außer der Monosubstitution wurde auch eine Kombination von zuvor aktiven Substituenten und damit eine Multisubstitution am Benzolring durchgeführt. Dies führte zu aktiven Verbindungen wie **Schl-33.588**, brachte jedoch keine signifikante Wirkungssteigerung oder Verbesserung hinsichtlich des zytotoxischen Potenzials.



**Abbildung 206:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit Benzolsulfonamid-Teilstruktur

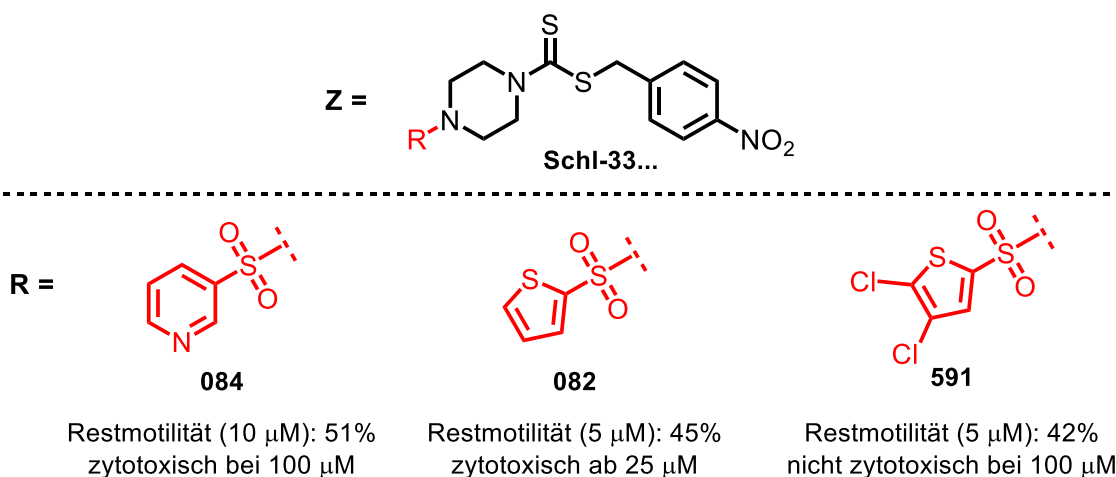
Weitere Strukturvariationen am Phenylrest verliefen dann vornehmlich in der *para*-Position. Hier wurden unter anderem verschieden lange und sterisch unterschiedlich anspruchsvolle Alkylketten eingeführt, wodurch Verbindungen wie **Schl-33.081** entstanden. Ebenso wurde die *para*-Position mit Fünf- und Sechsring-Systemen verknüpft, die zudem unterschiedlich viele Heteroatome wie in **Schl-33.572** oder **Schl-33.353** trugen und bei 10  $\mu\text{M}$  aktiv waren. Durch das Einführen einer Methylen-Gruppe zwischen dem Benzolring und der Sulfonyl-Gruppe wurde die Benzyl-substituierte Verbindung **Schl-33.491** dargestellt, die bei 10  $\mu\text{M}$  deutlich aktiv war und starke Tegumentschäden verursachte. Insgesamt wurden so sechzehn weitere Sulfonamid-Derivate synthetisiert und *in vitro* getestet. Vor allem **Schl-33.081** und **Schl-33.353** zeigten dabei verglichen mit dem unsubstituierten Benzol-Derivat **Schl-32.330** eine verbesserte Wirkung und zugleich bis 100  $\mu\text{M}$  keine Zytotoxizität.



**Abbildung 207:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit aromatischer Sulfonamid-Teilstruktur

Der Phenylrest wurde im nächsten Schritt durch andere aromatische Heterozyklen ersetzt. Besonders aktiv waren das Pyridin-3-yl-Derivat **Schl-33.084** und das 2-Thiophenyl-Derivat **Schl-33.082**, das bis 5  $\mu\text{M}$  wirksam jedoch ab 25  $\mu\text{M}$  auch zytotoxisch war und zu schweren Darmdilatationen in Weibchen führte. Der Thiophenyl-Rest wurde daraufhin hinsichtlich der Verknüpfungsposition der Sulfonylgruppe und elektronischer Einflüsse untersucht. Auch eine Ringvergrößerung durch Annelierung mit einem Benzolring wurde vorgenommen. Dabei wurde mit dem 4,5-Dichlor-substituierten Derivat **Schl-33.591** eine

hinsichtlich der antischistosomalen Aktivität verglichen mit **Schl-33.082** weniger wirksame jedoch zugleich weniger zellschädigende Verbindung gefunden. Insgesamt umfassten die Synthese und *in-vitro*-Testung dreizehn heteroaromatische Sulfonamid-Derivate.

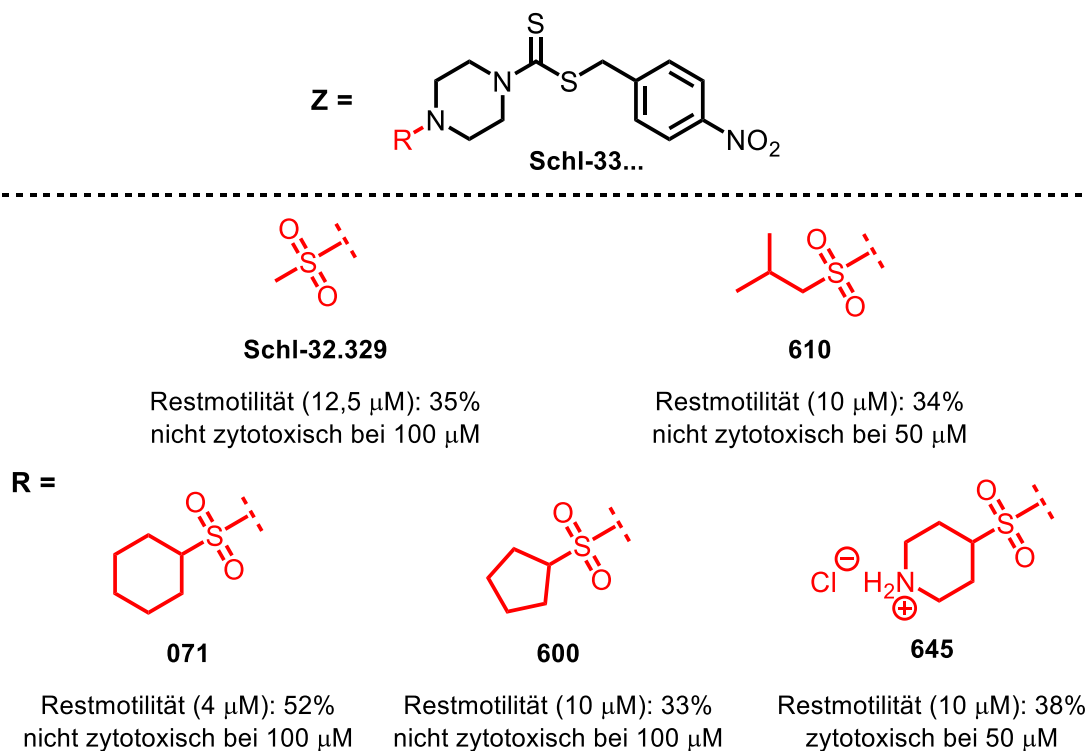


**Abbildung 208:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit heteroaromatischer Sulfonamid-Teilstruktur

Da sich auch Verbindungen mit kleinen Alkyl- und Cycloalkylsubstituenten in der Arbeit von P. MÄDER als antischistosomal gezeigt hatten, wurde eine Substitution des Alkylrestes mit kleinen polaren Gruppen angestrebt. Dazu wurden verschiedene Synthesestrategien verfolgt: (1) die Schützung und darauffolgende Aktivierung eines Aminosulfonats, (2) die nucleophile Substitution an einem (2-Chlorethyl)sulfonylpiperazin-Derivat, (3) die elektrophile Addition an einem Vinylsulfonamid-Derivat sowie (4) dessen Epoxidierung und Bishydroxylierung aber auch (5) die Oxidation von Mercaptoessigsäuremethylester mit Chlorgas. Alle Synthesversuche blieben jedoch erfolglos.

Allerdings führte die Synthese von weiteren aliphatischen und alizyklischen Sulfonamid-Derivaten wie **Schl-33.610** und **Schl-33.071** zu überaus aktiven Verbindungen. Diese übertrafen in ihrer Wirksamkeit auch die *bis dato* aktivste Verbindung mit dem 1-(Methylsulfonyl)-Rest **Schl-32.329** aus der Arbeit von P. MÄDER, der eine Wirksamkeit ab 12,5  $\mu\text{M}$  in dieser Arbeit zugeschrieben werden konnte. Insbesondere das Cyclohexyl-Derivat **Schl-33.071**, das bei einer Konzentration zwischen 3-4  $\mu\text{M}$  noch aktiv und damit um Faktor 2,5-3,0 besser wirksam war, ist hier zu nennen. Das Cyclohexyl-Derivat führte neben starken Darmdilatationen auch zu einer deutlichen Schädigung des Teguments; dabei besaß es keine Zytotoxizität bis 100  $\mu\text{M}$ . Es empfahl sich daher eine weitere Optimierung dieser Verbindung. Außer einer Ringverengung und damit der Synthese von **Schl-33.600** erfolgte die Einführung von Heteroatomen in der 4-Position des 6-gliedrigen Zyklus, die diesen polarer machten. Dies führte unter anderem zu dem Piperazin-Derivat **Schl-33.645**. So entstanden bei 10  $\mu\text{M}$  aktive Verbindungen, die allerdings unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  an Wirksamkeit einbüßten und

wie im Falle von **Schl-33.645** verglichen mit **Schl-33.071** stärker auf die Zellviabilität Einfluss nahmen.



**Abbildung 209:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit aliphatischer oder alizyklischer Sulfonamid-Teilstruktur

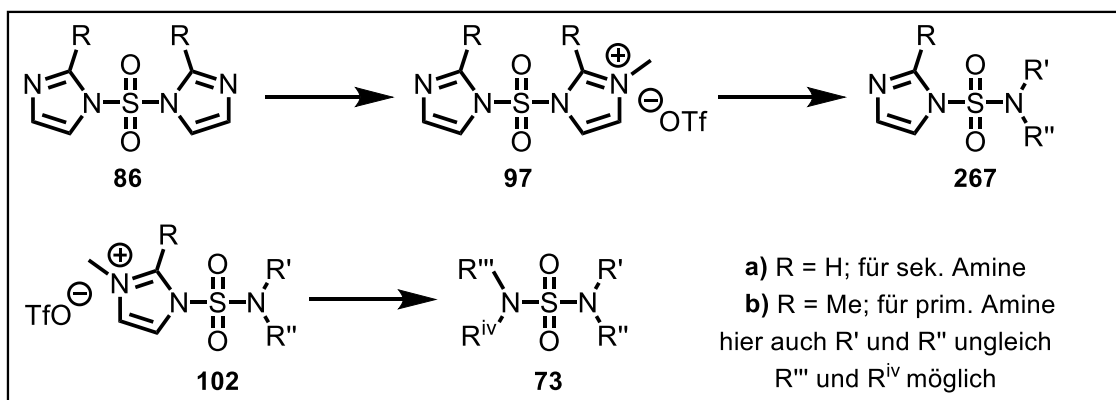
Zusammenfassend wurden fünfundsiebzig neuartige Sulfonamid-Derivate dargestellt. Von diesen waren neunundzwanzig bei der initial getesteten Konzentration von 10 µM aktiv und davon vier auch noch bei 5 µM. Eines der Derivate zeigte sogar noch in der Größenordnung bis 3 µM antischistosomale Wirksamkeit. Von den neunundzwanzig aktiven Derivaten wurden fünfundzwanzig auf ihr zytotoxisches Potenzial hin untersucht. Davon zeigten elf gegenüber mindestens einer der verwendeten Zelllinien bis 100 µM keine Toxizität. Die drei besten Derivate der Substanzklasse der Sulfonamide hinsichtlich der antischistosomalen Wirksamkeit und des Zytotoxizitätsprofils waren in aufsteigender Reihenfolge: **Schl-33.353**, **Schl-33.081** und **Schl-33.071**.

### Schwefelsäurediamide mit Piperazin-Teilgerüst

Neben der Synthese von Sulfonamid-Derivaten galt das Interesse auch der Synthese von weiteren Schwefelsäurediamid-Derivaten. Bisher war in dieser Substanzklasse nur die Verbindung **Schl-32.361** ausgehend von *N,N*-Dimethylsulfamoylchlorid hergestellt worden. Diese war zwischen 20 µM und 22,5 µM aktiv, wirkte bei 100 µM aber auch auf HepG2-Zellen. Die Einführung eines weiteren Stickstoffatoms sollte gegenüber den Sulfonamiden zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit führen. Da Sulfamoylchloride nur eingeschränkt kommerziell

erhältlich sind, musste zunächst eine Syntheseroute für die Darstellung der Schwefelsäurediamid-Derivate gefunden werden. Eine umfassende Literatur-Recherche zeigte, dass sich in der Literatur außer zahlreichen Patentschriften überwiegend klassische Reaktionsführungen finden, die mit harschen Reaktionsbedingungen einhergehen und eine Substratvielfalt nicht gewährleisten. Mehrere Synthesemethoden wurden erprobt, wie etwa eine Syntheseroute ausgehend von:

(1) Sulfurylchlorid, (2) Chlorsulfonylisocyanat, (3) *N*-Sulfamoyloxazolidinon. Das gewünschte unsymmetrische Schwefelsäurediamid entstand jedoch in keinem der Fälle, vielmehr kam es verstärkt auch zur Bildung des entsprechend symmetrischen Schwefelsäurediamids. Dennoch konnte eine Syntheseroute zur Darstellung von unsymmetrischen Schwefelsäurediamiden (**73**) ausgehend von *N,N'*-Sulfurylbisimidazol (**86**) gefunden werden (**Schema 100**). Deren Schlüsselschritt ist die sequenzielle Alkylierung nur eines Imidazolrestes und damit dessen Überführung in eine bessere Abgangsgruppe. Damit lassen sich unsymmetrische Schwefelsäurediamide durch aufeinander folgende Substitution mit zwei unterschiedlichen Aminen darstellen.

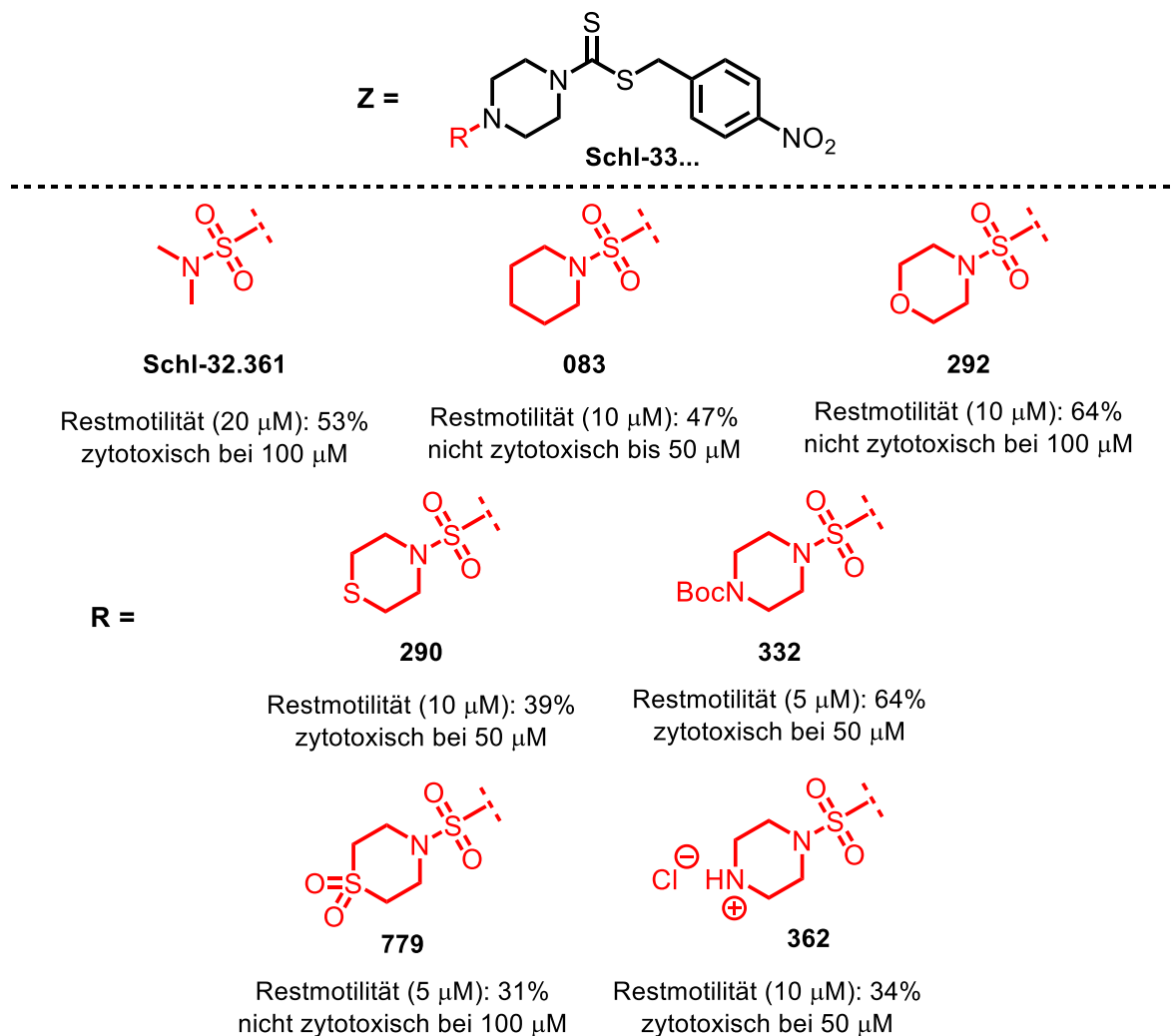


**Schema 100:** Erfolgreich genutzte Syntheseroute zur Darstellung von unsymmetrischen Schwefelsäurediamiden aus primären und sekundären Aminen

Die Syntheseroute wurde zunächst für symmetrisch substituierte Diamine genutzt, eignete sich in leicht abgewandelter Form aber auch zur Umsetzung mit primären Aminen. Insgesamt wurden vierzehn Schwefelsäurediamid-Derivate durch Reaktion des Sulfonylimidazolium-Salzes mit primären Aminen, Hydroxylamin oder Ammoniak erhalten und sechsundvierzig Derivate durch Reaktion mit einem sekundären Amin. Eine Ausweitung der Syntheseroute auf andere Nucleophile insbesondere zur Darstellung von Schwefelsäureamidestern und Schwefelsäureamidhydraziden war nicht möglich.

Es zeigte sich, dass die durch die Reaktion mit einem primären Amin erhaltenen und damit tri-substituierten Schwefelsäurediamid-Derivate gegenüber den tetra-substituierten Schwefelsäurediamid-Derivaten zum einen schwieriger darzustellen waren, zum anderen aber

auch in der anschließenden *in-vitro*-Testung weniger aktiv waren. Ausgehend von sekundären Aminen führten zunächst das Morpholin-Derivat **Schl-33.292**, das Thiomorpholin-Derivat **Schl-33.290** und das Derivat **Schl-33.332** mit mono-Boc-Piperazin-Rest zu bei 10  $\mu\text{M}$  aktiven Schwefelsäurediamid-Derivaten mit deutlichen Phänotypen. All diese Verbindungen entstanden als Strukturvarianten des ebenfalls aktiven Piperidin-Derivats **Schl-33.083**. Aktiver waren dabei **Schl-33.290** und **Schl-33.332**, wobei letzteres bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wirkte. Diese Derivate waren bei 50  $\mu\text{M}$  aber bereits zytotoxisch.

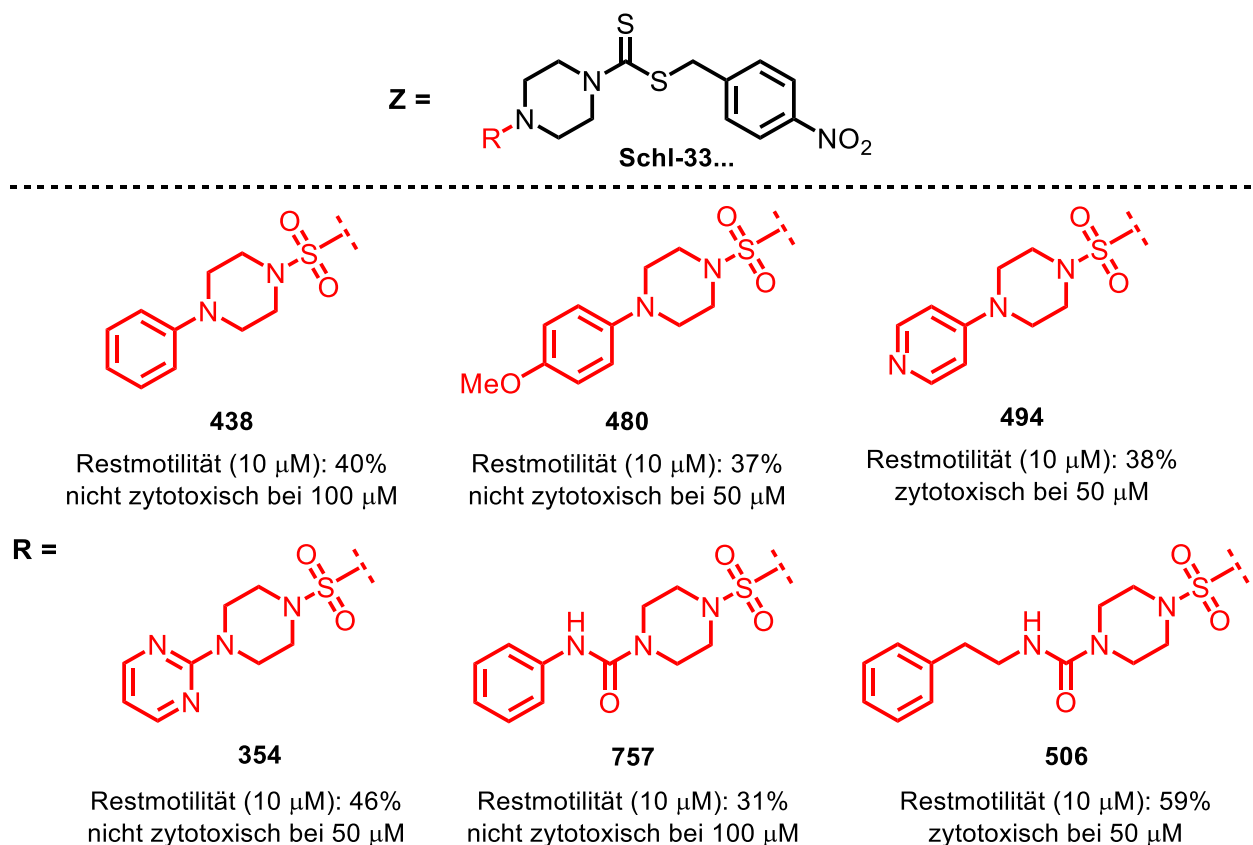


**Abbildung 210:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit Piperidin-analoger Schwefelsäurediamid-Teilstruktur

Die Optimierung dieser beiden Verbindungen führte im ersten Fall über die Oxidation des Schwefelatoms zu dem Thiomorpholin-Dioxid-Derivat **Schl-33.779**, das selbst bei 5  $\mu\text{M}$  noch letal war und starke Darmdilatationen sowie Tegumentschäden zeigte und zudem bis 100  $\mu\text{M}$  zellverträglich war. Damit war es um Faktor 4-4,5 besser wirksam als das Schwefelsäurediamid **Schl-32.361** aus der Arbeit von P. MÄDER, das als Ausgangspunkt der Schwefelsäurediamide galt. Das mono-Boc-Piperazin-Derivat **Schl-33.332** wurde zunächst durch Boc-Entschüttung im Säuren in das Piperazin-Hydrochlorid-Derivat **Schl-33.362**

überführt, das zwar nur noch bei 10  $\mu\text{M}$  wirkte, bei dieser Konzentration aber hinsichtlich der Wirkung mit dem mono-Boc-Piperazin-Derivat **Schl-33.332** vergleichbar war. Jedoch zeigte es ab 50  $\mu\text{M}$  ebenfalls Zytotoxizität. Es führte zu starken bis sehr starken Darmdilataationen nicht nur an den Weibchen.

Die freie Aminogruppe in der 4-Position des Piperazin-Rings von **Schl-33.362** wurde im nächsten Schritt umfassend derivatisiert. Das Phenylpiperazin-Derivat **Schl-33.438** zeigte *in vitro* eine Wirkung. Daraufhin wurde der aromatische Ring in *para*-Position substituiert und Reste mit unterschiedlichem elektronischen Effekt eingeführt, von denen nur die Verbindung **Schl-33.480** mit einer Methoxy-Gruppe bei 10  $\mu\text{M}$  antischistosomal aktiv und bis 50  $\mu\text{M}$  nicht toxisch war. Ergiebiger war der Austausch des Benzolrings gegen andere aromatische Sechsring-*N*-Heterozyklen. Das Aminopyridin-Derivat **Schl-33.494** war das aktivste der Pyridin-Derivate dieser Serie. Es bewirkte bei 10  $\mu\text{M}$  schwerste Tegumentschäden verbunden mit Blasenbildung und Ablösung des Teguments. Das Pyrimidinyl-Derivat **Schl-33.354** zeigte hinsichtlich der Reduktion der Motilität und Eiproduktion indessen noch bis 4  $\mu\text{M}$  eine schwache Wirkung und ein verbessertes Toxizitätsprofil.



**Abbildung 211:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit weitergehender Derivatisierung am Piperazin-Rest der Schwefelsäurediamid-Teilstruktur

Auch Verbindungen mit Harnstoff-Substituenten am Piperazin-Teilgerüst waren aktiv, darunter das Phenyl-Derivat **Schl-33.757** und das Phenethyl-Derivat **Schl-33.506**. Während

Erstgenanntes noch bei 5  $\mu\text{M}$  mittelstarke Darmdilatationen verursachte, zeigte Letztgenanntes auch noch bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  eine antischistosomale Aktivität.

Von den sechzig Schwefelsäurediamiden waren siebzehn bei der initial getesteten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aktiv. Davon wiederum wirkten fünf auch noch bei einer Konzentration 5  $\mu\text{M}$ . Zwei Verbindungen davon waren sogar bei 4  $\mu\text{M}$  noch wirksam. Von den siebzehn aktiven Derivaten konnten sechzehn wiederum in der Zellkultur untersucht werden. Es zeigte sich, dass insgesamt sechs Derivate bis 100  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Zellviabilität von HepG2- oder LS174T-Zellen nahmen. Die drei besten Derivate sind hier in aufsteigender Reihenfolge: **Schl-33.438**, **Schl-33.757** und **Schl-33.779**.

### Piperazin-Harnstoff-Derivate

Als **sekundäre Entwicklungslinie** wurde die Substanzklasse der Piperazin-Harnstoff-Derivate auf ihre antischistosomale Wirkung untersucht. So hatte P. MÄDER neben den Sulfonylpiperazin-Derivaten auch in der Substanzklasse der Acylpiperazin-Derivate Verbindungen mit guter Wirksamkeit gefunden. Harnstoffe wurden als möglicherweise ebenfalls aktiv erachtet. Anstrengungen hinsichtlich Synthese und Testung von etwaigen Verbindungen waren aber noch nicht unternommen worden.

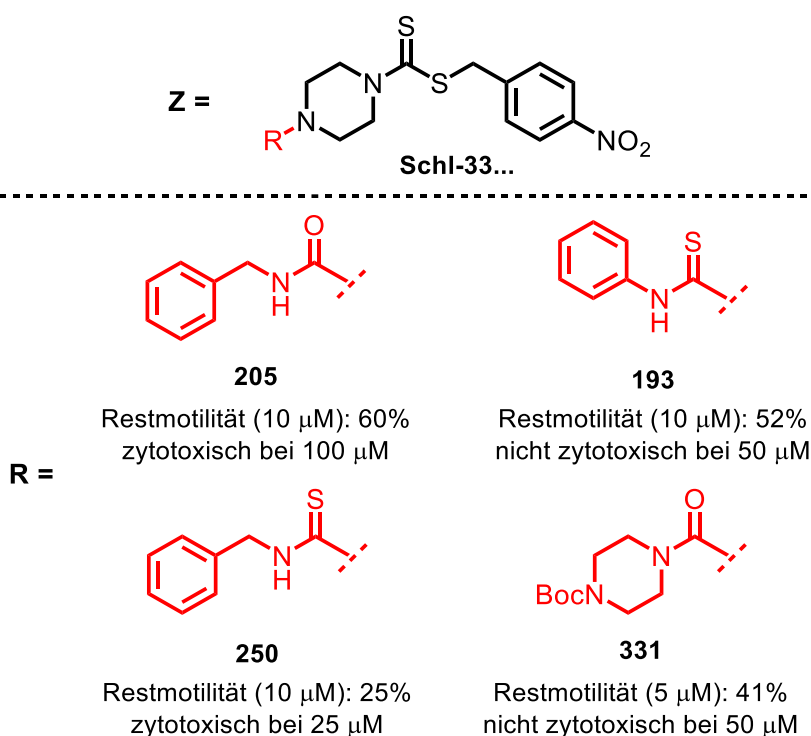
Eigene Synthesen gingen dabei entweder von Isocyanat oder 1,1'-Carbonyldiimidazol aus. Zunächst erfolgte die Synthese von Alkyl- und Cycloalkyl-Derivaten, die allesamt keine Wirkung zeigten. Zusätzlich zu den Harnstoffen mit Alkyl-Rest wurden auch solche mit Aryl-Rest dargestellt. Ausgehend von dem Benzyl-Derivat **Schl-33.205**, das bei 10  $\mu\text{M}$  aktiv war, wurden unterschiedlich lange Arylalkyl-Reste eingeführt. Ebenso wurde der Benzolring durch andere 5-Ring-Heteroaromaten ausgetauscht und die NH-Gruppe der zuvor tri-substituierten Harnstoff-Derivate alkyliert, was allerdings zu einem vollständigen Wirkungsverlust führte. Ferner wurde die Carbonylgruppe durch eine Thiocarbonylgruppe ersetzt und die Verbindungen **Schl-33.250** und **Schl-33.193** dargestellt. Insgesamt entstanden hier neunzehn Harnstoff-Derivate, von denen das Benzyl-Thioharnstoff-Derivat **Schl-33.250** bei 10  $\mu\text{M}$  am aktivsten, jedoch zugleich ab 25  $\mu\text{M}$  zellschädigend war.

Nicht nur Harnstoffe mit Alkyl- und Aryl-Rest wurden untersucht, sondern auch sechzehn tetra-substituierte Harnstoff-Derivate mit Piperidin-analoger Struktur dargestellt, die darauffolgend mit einem weiteren Heteroatom in der 4-Position des Piperidin-Rings substituiert wurden. Insbesondere das mono-Boc-Bispiperazinyl-Harnstoff-Derivat **Schl-33.331**, das bei 10  $\mu\text{M}$  neben Tegumentschäden auch zu starken Darmdilatationen an den Männchen führte, stellte sich als überaus aktiv heraus. Es war hinsichtlich der Motilität bis 5  $\mu\text{M}$  und hinsichtlich der Reduktion der Eiproduktion sogar bis 4  $\mu\text{M}$  aktiv. Das Stickstoffatom in 4-Position des



Piperazin-Rings wurde daraufhin alkyliert, acyliert, sulfonyliert sowie sulfamoyliert. Die *N*-Substitution führte allerdings zu annähernd unwirksamen Verbindungen.

Damit konnte gezeigt werden, dass auch aus der Substanzklasse der Piperazin-Harnstoff-Derivate aktive Verbindungen hervorgehen, wobei deren Aktivität, die von strukturanalogen Carbonsäureamid-Derivaten übertraf. Thioharnstoff-Derivate waren dabei im Regelfall aktiver als vergleichbare Harnstoff-Derivate. Zusammenfassend waren die Piperazinsulfonamid-Derivate aktiver als die entsprechenden Schwefelsäurediamid-Verbindungen; diese wiederum waren aktiver als die Piperazin-Harnstoff-Derivate.



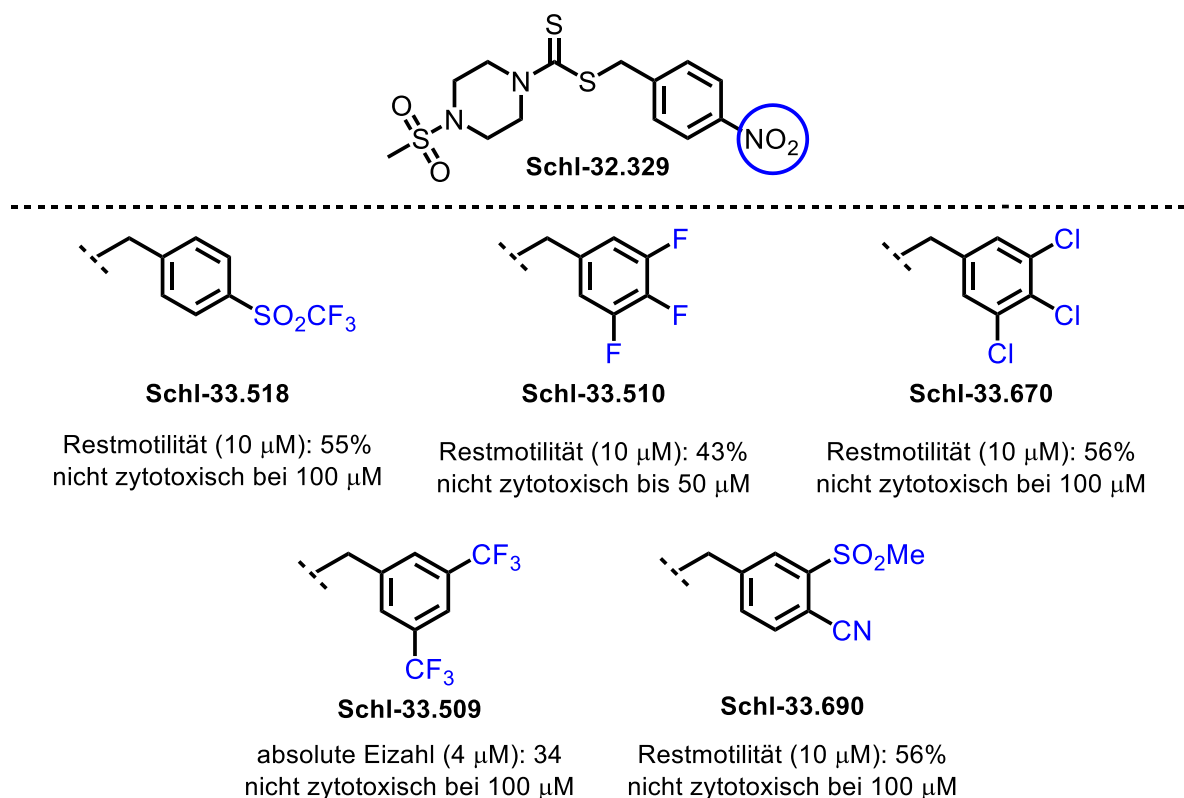
**Abbildung 212:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit (Thio)-Harnstoff-Teilstruktur

Von insgesamt fünfunddreißig Harnstoff-Derivaten waren vier bei einer Konzentration von 10 µM und davon wiederum eins bis zu einer Konzentration von 4 µM aktiv. Alle Harnstoff- und Thioharnstoff-Derivate waren jedoch ab 100 µM zytotoxisch. Dabei wirkten die Thioharnstoff-Derivate noch etwas stärker zellschädigend.

### Ersatz der Nitro-Gruppe in *para*-Position des *S*-Benzyl-Restes

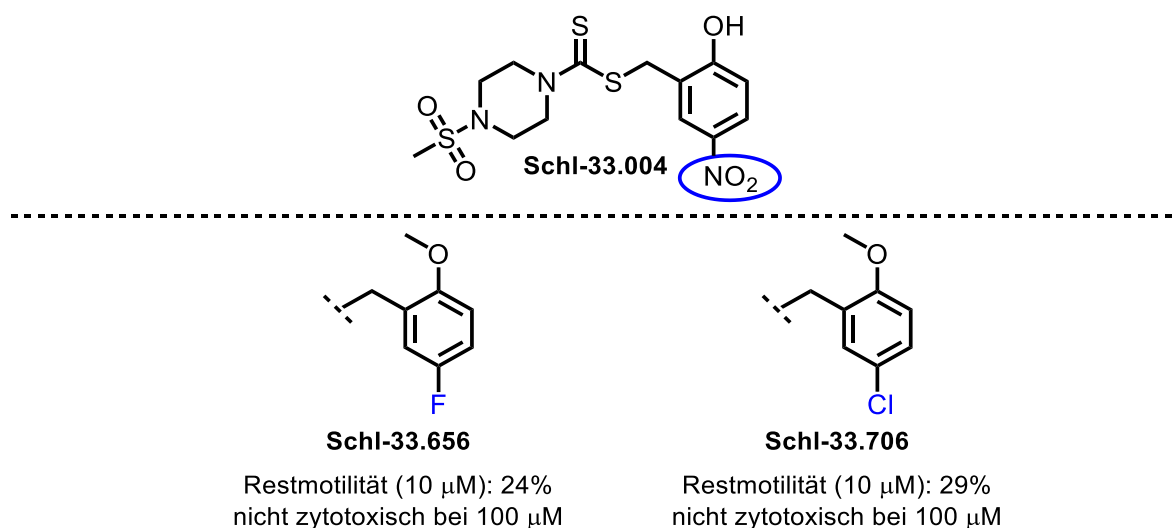
Außer der Derivatisierung des *N*-Piperazin-Restes der Dithiocarbamat-Derivate wurde die Substitution der Nitro-Gruppe in 4-Position des Benzylrestes auf Seiten des einfach gebundenen Schwefelatoms vorgenommen. Dieser Rest hatte sich in der Arbeit von P. MÄDER in besonderem Maße als aktiv herausgestellt, sollte aufgrund seiner inhärenten Problematik in Wirkstoffen nun aber ausgetauscht werden. Dazu wurden mehrere Ansätze verfolgt:

(1) Monosubstitution durch elektronenziehende Gruppen, (2) Multisubstitution zur Erzeugung eines des Nitrophenyl-Substituenten vergleichbaren Dipolmoments, (3) Substitution durch Gruppen mit ähnlicher Geometrie und Fähigkeit zur Ausbildung vergleichbarer Wechselwirkungen, (4) Substitution durch Gruppen mit identischer Molekülform und Volumen sowie ungefähr gleicher Verteilung der Elektronen (Bioisostere), (5) Substitution durch  $\pi$ -elektronenarme Heteroaromaten. Dabei zeigte sich, dass ein Ersatz der Nitro-Gruppe nicht ohne Reduktion der antischistosomalen Wirkung möglich war. Außer dem (Trifluormethyl)sulfonyl-Benzylderivat **Schl-33.518**, das hauptsächlich die Motilität, Paarungsstabilität und Eiproduktion bei 10  $\mu\text{M}$  beeinflusste, war auch das 3,4,5-Trifluorbenzyl-Derivat **Schl-33.510** aktiv und führte darüber hinaus zu mittelstarken Tegumentschäden. Weitere Optimierungen von **Schl-33.510** führten zu dem 3,4,5-Trichlorbenzyl-Derivat **Schl-33.670** das zwar weniger aktiv als dieses war, aber dafür bis 100  $\mu\text{M}$  im Zellkulturassay unauffällig blieb. Weiterhin entstand das 3,5-Bis(trifluormethyl)benzyl-Derivat **Schl-33.509**, welches ausschließlich auf den Paarungszustand der Schistosomen und deren Eiproduktion, das allerdings noch bis zu einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$ , Einfluss nahm. Auch die Kombination einer Cyano- mit einer Sulfonylmethylgruppe am Benzolring führte in der Gestalt von **Schl-33.690** zu einem schwach aktiven Derivat.



**Abbildung 213:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit in *para*-Position ersetzter Nitro-Gruppe

Da in der Arbeit von P. MÄDER außer einem *para*-Nitrobenzyl-Rest auch ein 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl-Rest auf der Schwefelseite geduldet wurde, galt es auch die Nitrogruppe in der Verbindung **Schl-33.004** zu ersetzen. Dies geschah durch elektronenziehende Substituenten. Die Synthese verlief dabei über entsprechend substituierte Methylphenylether, wobei der Ether im letzten Schritt der Synthese gespalten wurde. Auch die Phenolether als Zwischenprodukte der Synthese wurden getestet. Besonders aktiv waren das 2-Fluor- oder 2-Chlor-5-methoxybenzyl-Derivat **Schl-33.656** und **Schl-33.706**, die außer, dass sie zu überaus starken bzw. starken Darmdilatationen bei 10  $\mu\text{M}$  führten, noch letal und dabei nicht zytotoxisch waren. Damit gelang auch der Ersatz der Nitro-Gruppe am 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl.



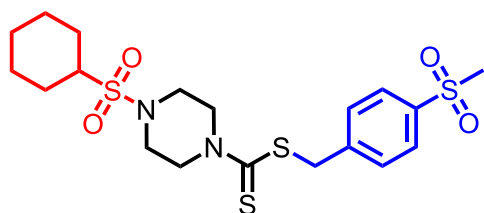
**Abbildung 214:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate mit in 5-Position ersetzter Nitrogruppe

Von den siebenunddreißig Derivaten, die im Kontext des Ersatzes der Nitro-Gruppe entstanden, waren zehn bei 10  $\mu\text{M}$  und davon wiederum drei auch noch bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  aktiv. Zwei der Verbindungen wirkten sogar bis 4  $\mu\text{M}$ . Insgesamt wurde von sieben der antischistosomal aktiven Derivate die zellschädigende Wirkung bestimmt. Diese war bei sechs der Verbindungen bis 100  $\mu\text{M}$  gegenüber der HepG2-Zelllinie nicht vorhanden. Die beiden besten Derivate waren **Schl-33.656** und **Schl-33.509**.

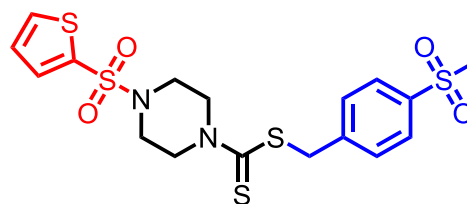
### Kombinationsserien und Austausch der Dithiocarbamat-Funktion

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der Substanzklasse der Dithiocarbamat-Derivate wurden die zu jenem Zeitpunkt wirksamsten Substituenten am einfach gebundenen Schwefelatom des Dithiocarbamats aus der Arbeit von P. MÄDER mit den wirksamsten Substituenten am endständigen Stickstoffatom des Piperazins kombiniert. Durch die Addition der Einzeleffekte der zuvor gut wirksamen Substituenten sollte eine Wirkungssteigerung erzielt werden. Dabei entstanden in zwei Kombinationsserien insgesamt nochmals achtundsiebzig

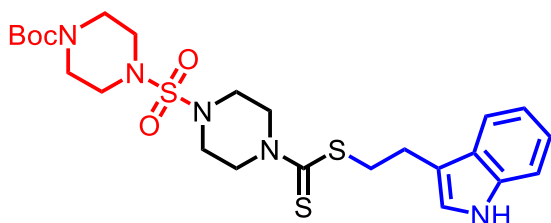
Derivate mit vereinzelt durchaus gesteigerter Aktivität auch noch unterhalb von 5  $\mu\text{M}$  und keiner Zytotoxizität bis 100  $\mu\text{M}$ . Besonders aktiv waren jene Derivate, die anstelle des *para*-Nitrobenzyl-Restes einen 4-(Methylsulfonyl)benzyl- (**Schl-32.635** oder **Schl-32.507**), einen 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl- (**Schl-32.692** oder **Schl-32.691**) oder (7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methyl-Rest (**Schl-32.504** oder **Schl-32.614**) trugen, wobei die Wirksamkeit und Güte des Zytotoxizitätsprofils über alle Derivate gemittelt in der angegebenen Reihenfolge abnimmt. Damit konnten weitere aktive Derivate dargestellt werden, die keine Nitrogruppe tragen.

**Schl-33.635**

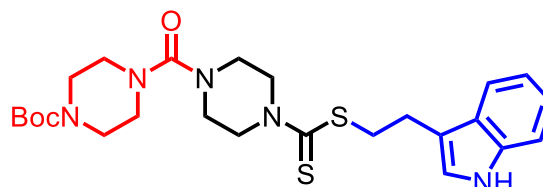
Restmotilität (4  $\mu\text{M}$ ): 49%  
nicht zytotoxisch bei 100  $\mu\text{M}$

**Schl-33.507**

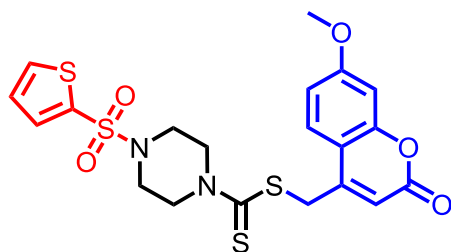
Restmotilität (5  $\mu\text{M}$ ): 48%  
nicht zytotoxisch bei 100  $\mu\text{M}$

**Schl-33.692**

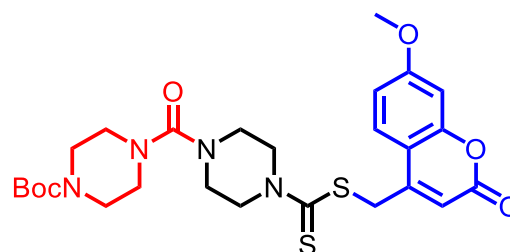
Restmotilität (4  $\mu\text{M}$ ): 58%  
nicht zytotoxisch bei 100  $\mu\text{M}$

**Schl-33.691**

Restmotilität (10  $\mu\text{M}$ ): 46%  
nicht zytotoxisch bei 100  $\mu\text{M}$

**Schl-33.504**

Restmotilität (10  $\mu\text{M}$ ): 52%  
nicht zytotoxisch bei 100  $\mu\text{M}$

**Schl-33.614**

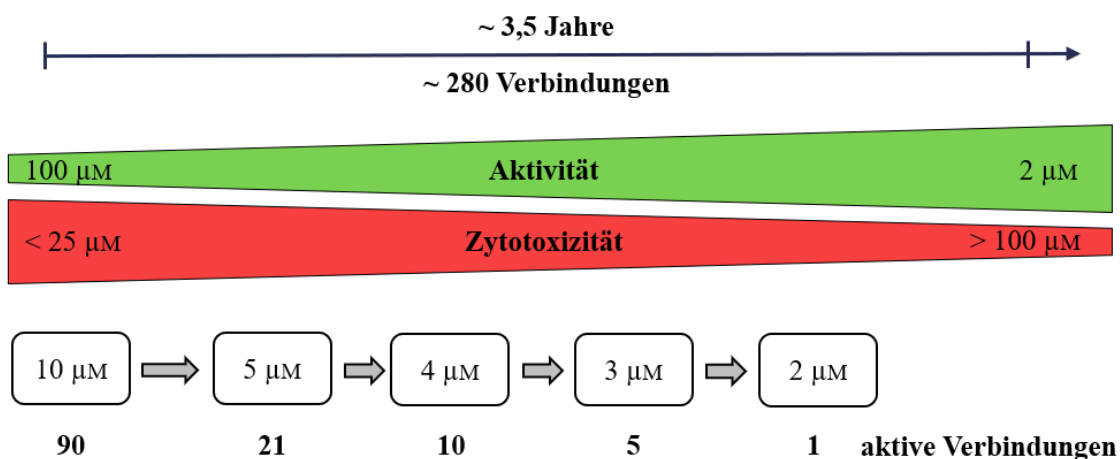
Restmotilität (10  $\mu\text{M}$ ): 42%  
nicht zytotoxisch bei 50  $\mu\text{M}$

**Abbildung 215:** Beispiele für antischistosomal aktive Dithiocarbamat-Derivate der Kombinationsserien

In der Summe waren von den achtundsiebzig Derivaten der Kombinationsserien dreißig bei 10  $\mu\text{M}$  und davon wiederum acht auch noch bei 5  $\mu\text{M}$  aktiv. Vier der Verbindungen wirkten auch noch bei 3  $\mu\text{M}$  und eine bei 2  $\mu\text{M}$ . Vierundzwanzig der dreißig aktiven Derivate wurden auf ihre Zytotoxizität getestet. Elf inhibierten das Wachstum mindestens einer der untersuchten Zelllinien selbst bei 100  $\mu\text{M}$  nicht.

Weiterhin konnte durch den Austausch der Heteroatome in der Dithiocarbamat-Grundstruktur und Darstellung eines Harnstoff-, Carbamat- und Thiolurethan-Derivats in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese für die antischistosomale Wirkung unabdingbar und damit nicht zu ersetzen ist.

Somit entstanden in dieser Arbeit 276 neuartige Dithiocarbamat-Derivate. Auch wurde ein *up-Scaling* bestehender Synthesen für weiterführende Testungen vorgenommen. Dafür wurden zahlreiche, bereits bekannte Verbindungen im Multigramm-Maßstab von bis zu 5 g erneut synthetisiert. Für die biologische Testung an adulten *S. mansoni* wurden etwa 22.000 Würmer verwendet und etwa 580.000 Eier gezählt. Von den 276 Verbindungen waren neunzig bei der initial getesteten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aktiv. Davon wirkten auch noch einundzwanzig bei 5  $\mu\text{M}$  und davon wiederum zehn bei 4  $\mu\text{M}$ . Fünf der Verbindungen waren auch noch bei 3  $\mu\text{M}$  und eine Verbindung bei 2  $\mu\text{M}$  zumindest schwach aktiv. Während bei 10  $\mu\text{M}$  auch Phänotypen stark ausgeprägt waren und vereinzelt letale Effekte auftraten, waren bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  nur noch einzelne Parameter wie etwa die Motilität oder Eiproduktion von einer Wirkung betroffen. Der Wirkungsbereich der wirksamsten Dithiocarbamat-Derivate ist mit dem Wirkbereich von Praziquantel *in vitro* in etwa vergleichbar. Dabei sei an dieser Stelle angemerkt, dass PZQ eine frühzeitigere Wirkung entfaltet, die sich in der Intensität vor allem in den niedrigen Konzentrationsbereichen von der, der Dithiocarbamat-Derivate unterscheidet. Auch der Wirkmechanismus scheint ein grundlegend anderer zu sein, da Praziquantel neben einem paralytischen Effekt zu einem ödematösen Aufquellen der Schistosomen sowie Tegumentschäden *in vitro* führt. Die Dithiocarbamat-Derivate hingegen zeigten als primären Phänotyp Darmdilatationen.



**Abbildung 216:** Wesentliche Punkte der Arbeit (Zeitansatz, Anzahl an synthetisierten Verbindungen, Aktivitätssteigerung ausgehend von Disulfiram, Entwicklung der Zytotoxizität ausgehend von Disulfiram, Konzentrationen bei der *in-vitro*-Testung sowie Anzahl der bei diesen Konzentrationen aktiven Verbindungen)

Alle bei 10 µM antischistosomal aktiven Verbindungen wurden in der Zellkultur in Kooperation mit Prof. GRÜNWELLER gegenüber der HepG2- und LS174T-Zelllinie auf ihr zytotoxisches Potenzial untersucht. Von insgesamt sechsundsiebzig Derivaten, für die die Zytotoxizität bestimmt werden konnte (einige Verbindungen konnten aufgrund unzureichender Wasserlöslichkeit nicht gemessen werden), waren dreiunddreißig bei 100 µM nicht zytotoxisch, acht davon waren auch noch bei Konzentrationen  $\leq 5$  µM antischistosomal wirksam.

### Weiterreichende Testungen

Zusätzlich zu den routinemäßig durchgeführten Testungen an adulten *S. mansoni* über einen Zeitraum von 72 h, wurden ausgewählte Verbindungen auch Langzeit-Testungen von bis zu 120 h unterzogen, um somit die Letalitätsgrenze aller Schistosomen in Kultur zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass insbesondere innerhalb des Zeitintervalls von 72 h auf 96 h gegenüber dem von 96 h auf 120 h nochmals ein deutlicher Zugewinn an Aktivität bezogen auf die Reduktion der Motilität zu verzeichnen war. Restmotilitäten lagen nach 120 h dann schließlich im Schnitt zwischen 5% und 10%. Damit führten alle der getesteten Verbindungen zu deutlich letalen Effekten. Zudem wurde eine Auswaschung der Inhibitoren nach einer Inkubationszeit von 24 h vorgenommen. Die Würmer wurden dazu in ein frisches Nährmedium überführt. Dadurch sollte unter anderem die Irreversibilität der antischistosomalen Wirkung gezeigt werden. Wenngleich alle Verbindungen nach nur 24 h Inkubationszeit eine verminderte Wirkung an *S. mansoni* hervorriefen, so war diese, sofern sie innerhalb von 24 h aufgetreten war, im Allgemeinen unumkehrbar. Demnach glichen sich vor allem auch reduzierte Eizahlen und Motilitäten nach dem Absetzen des Inhibitors nicht der Norm an. Auch dies stellt einen Unterschied zu der durch Praziquantel verursachten Paralyse dar, die zunächst aufgehoben werden kann. Neben der Testung an adulten Schistosomen wurde auch eine initiale Testung ausgewählter Verbindungen gegen das juvenile Stadium durchgeführt. Eine bedeutende Wirkung in Form von phänotypischen Veränderungen konnte dabei allerdings nicht beobachtet werden. Dennoch konnte inzwischen gezeigt werden, dass Dithiocarbamate insbesondere früherer Entwicklungslinien, die von der Gestalt her dem Disulfiram noch ähnlicher sind, sogar zu letalen Effekten bis zu Konzentrationen von 500 nM führen. Die Dithiocarbamat-Derivate erwiesen sich nicht nur gegenüber der Art *S. mansoni*, sondern auch gegenüber *S. japonicum* aktiv, was einen Vorteil gegenüber Oxamniquin bedeutet. Unterschiede in der Wirkung zeigten sich hier vor allem bezüglich des Auftretens von Entpaarungen. Diese lagen zwischen 40% und 70%. Insgesamt war die Wirkung auf *S. mansoni* dabei stärker ausgeprägt.

Um das weitere antiparasitäre Potential der Stoffklasse der Dithiocarbamat-Derivate zu ermitteln, wurden diese zudem in Kooperation mit den Arbeitskreisen HEMPHILL/LUNDSTRÖM-

STADELMANN und GREVELDING/HÄBERLEIN gegen den Fuchsbandwurm (*E. multilocularis*) und den großen Leberegel (*F. hepatica*) getestet. Dabei wurde im erstgenannten Fall ein möglicher Pharmakophor identifiziert, den es derzeit noch zu überprüfen gilt. Im Falle der Testung an *F. hepatica* wurden Verbindungen gefunden, die *in vitro* vergleichbare Aktivität zu Triclabendazol, dem „Goldstandard“, zeigten. Ergebnisse (unter anderem) der Testungen an *Cryptosporidien* (AG TAUBERT) und an *P. falciparum* (AG PRZYBORSKI) stehen noch aus, beziehungsweise sind in Planung.

Neben der Synthese und biologischen Testung wurde der Frage eines potentiellen schistosomalen Targets der Verbindungen nachgegangen. Da diese allesamt von dem humanen ALDH-Inhibitor Disulfiram abgeleitet sind, wurde ein Homologiemodell der schistosomalen ALDH erstellt und die Verbindungen unter Zuhilfenahme des molekularen *Dockings* virtuell auf die Bindung an das Zielmolekül getestet. Dabei zeigte sich, dass die ALDH weniger wahrscheinlich das Target der antischistosomal aktiven Dithiocarbamate ist. So lassen sich vor allem die erhaltenen Struktur-Aktivitätsbeziehungen nicht mit den Ergebnissen des *Dockings* in Einklang bringen. Beispielsweise ist die Notwendigkeit der Dithiocarbamatfunktion, die sich durch etwaige Strukturmodifikationen *bis dato* nicht adäquat ersetzen ließ, anhand der Bindungsposen nicht nachvollziehbar.

In der Gestalt des humanen Aldose-Reduktase-Inhibitors Epalrestat und der entzündungshemmenden, antioxidativen und zytoprotektiven Organoselen-Verbindung Ebselen, die gegenüber *S. mansoni* wirksam waren, jedoch einer anderen Stoffklasse angehören, wurden zudem neue Ansatzpunkte für antischistosomal aktive Verbindungen gefunden. Beide Stoffklassen werden zukünftig weiterhin im Arbeitskreis bearbeitet. Außerdem wurde eine genauere morphologische Untersuchung insbesondere der Reproduktionsorgane und des Darm-Traktes der *in-vitro* mit einem Dithiocarbamat-Derivat behandelten Schistosomen unter dem Konfokalmikroskop durchgeführt. Es zeigte sich, dass primär das Darmlumen verändert und die Gastrodermis abgelöst war. Zusätzlich konnten Änderungen des Vitellariums wahrgenommen werden. Eine *in-silico*-gestützte Vorhersage der ADME-Tox-Parameter ermöglichte schließlich eine weitergehende Priorisierung antischistosomal aktiver Verbindungen. Ausgewählte Verbindungen werden derzeit in Kooperation mit der Industrie (Dr. SPANGENBERG; MERCK KGaA) zur potenziellen Wirkstoffentwicklung gegen die Schistosomiasis weiter profiliert. Abhängig vom Ergebnis sollen dann *in vivo* Versuche mit Hamstern erfolgen. Ebenso soll die Verteilung der Dithiocarbamat-Derivate im Wurm mittels der abbildenden Massenspektrometrie (AG SPENGLER) untersucht werden, um somit auch Rückschlüsse auf den Wirkort zu erhalten.

## 5 Referenzverzeichnis

- [1] T. Sander, J. Freyss, M. Von Korff et al., *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55, 460–473.
- [2] R. Williams, W. P. Jencks, F. H. Westheimer et al., “pKa Data,” can be found under [http://www.fm.ehcc.kyoto-u.ac.jp/pKa\\_compilation\\_Williams\\_RipinEvans.pdf](http://www.fm.ehcc.kyoto-u.ac.jp/pKa_compilation_Williams_RipinEvans.pdf), September 27, 2020.
- [3] J. R. Herricks, P. J. Hotez, V. Wanga et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, e0005424.
- [4] C. Watts, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, e0005492.
- [5] WHO, “Schistosomiasis,” can be found under <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>, April 13, 2020.
- [6] A. Berry, J. Fillaux, G. Martin-Blondel et al., *Eurosurveillance* **2016**, 21 (30100).
- [7] J. Boissier, S. Grech-Angelini, B. L. Webster et al., *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16, 971–979.
- [8] B. Gryseels, K. Polman, J. Clerinx et al., *Lancet* **2006**, 368, 1106–1118.
- [9] WHO, “WHO | What is schistosomiasis?,” can be found under <https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>, April 20, 2020.
- [10] D. G. Colley, A. L. Bustinduy, W. E. Secor et al., *Lancet* **2014**, 383, 2253–2264.
- [11] P. J. Hotez, M. Alvarado, M.-G. Basáñez et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, 8, e2865.
- [12] WHO Expert Committee, *Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis*, Technical Report No 912, **2002**.
- [13] CDC, “CDC - Schistosomiasis,” can be found under <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/index.html>, April 20, 2020.
- [14] L. A. T. Tchuente, V. R. Southgate, F. Njiokou et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1997**, 91, 664–665.
- [15] T. Huyse, B. L. Webster, S. Geldof et al., *PLoS Pathog.* **2009**, 5, e1000571.
- [16] Y. Le Govic, J. Kincaid-Smith, J. F. Allienne et al., *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, 25, 365–367.
- [17] J. Depaquit, M. Akhouni, D. Haouchine et al., *Parasite* **2019**, 26 (10).
- [18] T. Elbaz, G. Esmat, *J. Adv. Res.* **2013**, 4, 445–452.
- [19] R. R. F. Candido, A. L. Morassutti, C. Graeff-Teixeira et al., in *Adv. Parasitol.*, Academic Press, **2018**, pp. 209–237.
- [20] “Schistosomiasis - Wissen für Mediziner,” can be found under <https://www.amboss.com/de/wissen/Schistosomiasis>, April 20, 2020.
- [21] T. P. Wang, J. Shrivastava, M. V. Johansen et al., *Int. J. Parasitol.* **2006**, 36, 1317–1325.
- [22] D. J. Gray, G. M. Williams, Y. Li et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, 77, 866–874.
- [23] C. J. Standley, L. Mugisha, A. P. Dobson et al., *J. Helminthol.* **2012**, 86, 131–140.
- [24] T. M. Bilharz, *Zeitschrift für wissenschaftliche Zool.* **1853**, 4, 72–76.
- [25] T. Bilharz, *Rev. Infect. Dis.* **1982**, 4, 727–732.
- [26] B. Gryseels, in *Hunter’s Trop. Med. Emerg. Infect. Dis.*, **2020**, pp. 905–917.
- [27] F. A. Lewis, M. S. Tucker, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, 766, 47–75.
- [28] S. A.-L. Thétiot-Laurent, J. Boissier, A. Robert et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 7936–7956.
- [29] A. F. Adenowo, B. E. Oyinloye, B. I. Ogunyinka et al., *Brazilian J. Infect. Dis.* **2015**, 19, 196–205.
- [30] J. R. Hackey, M. A. Stirewalt, *J. Parasitol.* **1956**, 42, 565–80.
- [31] M. A. Stirewalt, F. J. Kruidenier, *Exp. Parasitol.* **1961**, 11, 191–211.



- [32] G. N. Gobert, M. Chai, D. P. McManus, *Parasitology* **2007**, *134*, 453–460.
- [33] E. S. Loker, S. V. Brant, *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 521–528.
- [34] C. G. Greveling, *Curr. Biol.* **2004**, *14*, R545.
- [35] D. A. Erasmus, *Parasitology* **1973**, *67*, 165–183.
- [36] I. Popiel, D. Cioli, D. A. Erasmus, *Int. J. Parasitol.* **1984**, *14*, 183–190.
- [37] W. Kunz, *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 227–231.
- [38] Z. Lu, F. Sessler, N. Holroyd et al., *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–14.
- [39] A. Cheever, J. Macedonia, J. Mosimann et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *50*, 281–295.
- [40] “Trematodes | Basicmedical Key,” can be found under <https://basicmedicalkey.com/trematodes/>, April 20, 2020.
- [41] K. S. Warren, A. A. F. Mahmoud, P. Cummings et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1974**, *23*, 902–909.
- [42] D. Chabasse, G. Bertrand, J. P. Leroux et al., *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **1985**, *78*, 643–647.
- [43] P. J. Brindley, B. H. Kalinna, J. P. Dalton et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *89*, 1–9.
- [44] R. A. Zussman, P. M. Bauman, J. C. Petruska, *J. Parasitol.* **1970**, *56*, 75–79.
- [45] B. J. Bogitsh, *Exp. Parasitol.* **1978**, *45*, 247–254.
- [46] B. E. P. van Oordt, J. M. van den Heuvel, A. G. M. Tielens et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, *16*, 117–126.
- [47] J. Barrett, *Parasitology* **2009**, *136*, 1633–1642.
- [48] S. C. C. Huang, T. C. Freitas, E. Amiel et al., *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002996.
- [49] J. E. Grimes, D. Croll, W. E. Harrison et al., *Parasites and Vectors* **2015**, *8* (156).
- [50] D. Lowe, J. Xi, X. Meng et al., *Parasitol. Int.* **2005**, *54*, 83–89.
- [51] A. Fenwick, D. Rollinson, V. Southgate, *Adv. Parasitol.* **2006**, *61*, 567–622.
- [52] I. Takougang, J. Meli, J. W. Poné et al., *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2007**, *101*, 479–486.
- [53] E. González, *Dermatol. Clin.* **1989**, *7*, 291–300.
- [54] A. G. Ross, D. Vickers, G. R. Olds et al., *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*, 218–224.
- [55] E. Schwartz, *Clin. Chest Med.* **2002**, *23*, 433–443.
- [56] S. Fataar, A. G. Al Ansari, H. Bassiony et al., *Br. J. Radiol.* **1996**, *69*, 1064–1066.
- [57] K. M. T. Nunes, A. E. C. Cardoso, F. de S. G. Pereira et al., *An. Bras. Dermatol.* **2013**, *88*, 969–972.
- [58] T. J. de S. Vargas, R. Lopes, M. de L. P. F. N. Moraes et al., *An. Bras. Dermatol.* **2013**, *88*, 820–822.
- [59] E. J. Pearce, *Parasite Immunol.* **2005**, *27*, 265–270.
- [60] A. H. Costain, A. S. MacDonald, H. H. Smits, *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3042.
- [61] E. J. Pearce, A. S. MacDonald, *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 499–511.
- [62] E. Hams, G. Aviello, P. G. Fallon, *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 1–8.
- [63] C. Chuah, M. K. Jones, M. L. Burke et al., *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 141–150.
- [64] C. H. King, C. E. Keating, J. F. Muruka et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1988**, *39*, 361–368.
- [65] D. A. Schwartz, *Trop. Geogr. Med.* **1981**, *33*, 1–7.
- [66] E. F. Kjetland, P. D. C. Leutscher, P. D. Ndhlovu, *Trends Parasitol.* **2012**, *28*, 58–65.

- 
- [67] P. M. Jourdan, B. S. Randrianasolo, H. Feldmeier et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2013**, 32, 137–140.
  - [68] E. F. Kjetland, P. D. Ndhlovu, E. Gomo et al., *AIDS* **2006**, 20, 593–600.
  - [69] B. Gryseels, *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, 26, 383–397.
  - [70] L. A. C. Leite, A. L. C. Domingues, E. P. Lopes et al., *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2013**, 35, 332–336.
  - [71] Z. A. Andrade, *Parasite Immunol.* **2009**, 31, 656–663.
  - [72] I. Bica, D. H. Hamer, M. J. Stadecker, *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2000**, 14, 583–604.
  - [73] M. R. Kenawy, *Am. Heart J.* **1950**, 39, 678–696.
  - [74] S. Jauréguiberry, S. Ansart, L. Perez et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, 76, 964–966.
  - [75] F. J. C. Artal, H. M. Mesquita, R. D. A. Gepp et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2006**, 77, 512.
  - [76] M. Alsomaili, A. A. Abulaban, *Case Rep. Neurol.* **2016**, 8, 47–52.
  - [77] A. Ashour, T. Elserri, M. Nosser et al., *J. Craniovertebr. Junction Spine* **2018**, 9, 76–80.
  - [78] M. A. da Silva, G. A. Nai, N. T. Tashima et al., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2019**, 52, e20180335.
  - [79] N. Katz, A. Chaves, J. Pellegrino, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1972**, 14, 397–400.
  - [80] V. C. W. Tsang, P. P. Wilkins, *Immunol. Invest.* **1997**, 26, 175–188.
  - [81] D. Wichmann, S. Poppert, H. Von Thien et al., *BMC Infect. Dis.* **2013**, 13 (55).
  - [82] J. B. Christopherson, *Lancet* **1918**, 192, 325–327.
  - [83] D. Cioli, L. Pica-Mattoccia, S. Archer, *Pharmacol. Ther.* **1995**, 68, 35–85.
  - [84] H. W. Bond, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, 160, 519–529.
  - [85] G. W. Luttermoser, W. B. DeWitt, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1961**, 10, 541–546.
  - [86] R. Rodriguez-Molina, C. E. Acevedo, J. M. Torres et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1950**, 30, 881–886.
  - [87] H. Omar, *Med. J. Egypt. Armed Forces* **1956**, 2, 30–38.
  - [88] G. Baruffa, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1962**, 56, 143–148.
  - [89] P. Davis Marsden, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1985**, 18, 187–198.
  - [90] Bueding, E. M. Mansour, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1957**, 12, 159–165.
  - [91] E. Bueding, J. Fisher, *Biochem. Pharmacol.* **1966**, 15, 1197–1211.
  - [92] L. Rogers, *Br. Med. J.* **1912**, 1, 1424–1425.
  - [93] L. Rogers, *Br. Med. J.* **1912**, 2, 405–408.
  - [94] J. C. Micakins, *Br. Med. J.* **1917**, 2, 645–648.
  - [95] R. E. Dack, S; Moloshok, *Arch. Intern. Med.* **1947**, 79, 228–238.
  - [96] T. H. Brem, B. E. Konwaler, *Am. Heart J.* **1955**, 50, 476–481.
  - [97] H. H. Salem, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1965**, 59, 307–317.
  - [98] F. G. Cawston, *Br. Med. J.* **1922**, 2, 661.
  - [99] R. S. Gupta, L. Siminovitch, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 3978–3982.
  - [100] C. R. Lambert, P. Stauffer, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1964**, 58, 292–303.
  - [101] C. R. Lambert, M. Wilhelm, H. Striebel et al., *Experientia* **1964**, 20, 452–453.
  - [102] L. M. Werbel, E. F. Elslager, P. J. Islip et al., *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 1569–1572.
  - [103] H. L. Wolfe, *Lancet* **1967**, 289, 350–354.

- [104] F. Fontanilles, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, 160, 811–820.
- [105] A. Abdallah, M. Saif, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, 160, 686–695.
- [106] P. Jordan, *Br. Med. J.* **1966**, 1, 276–278.
- [107] A. Coutinho, F. T. Barreto, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, 160, 612–628.
- [108] H. K. Urman, O. Bulay, D. B. Clayson et al., *Cancer Lett.* **1975**, 1, 69–74.
- [109] J. W. Tracy, B. A. Catto, L. T. Webster, *Mol. Pharmacol.* **1983**, 24, 291–299.
- [110] L. M. Werbel, *Top. mednl Chem.* **1970**, 3, 125–169.
- [111] W. Lorenz, A. Henglein, G. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 2554–2556.
- [112] W. C. Campbell, A. C. Cuckler, *J. Parasitol.* **1966**, 52, 827–828.
- [113] L. M. Werbel, P. H. Thompson, *J. Med. Chem.* **1967**, 10, 32–36.
- [114] A. Davis, D. R. Bailey, *Bull. World Health Organ.* **1969**, 41, 209–224.
- [115] R. Pleština, A. Davis, & D. R. Bailey, *Bull. World Health Organ.* **1972**, 46, 747–759.
- [116] J. M. Jewsbury, M. J. Cooke, M. C. Weber, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1977**, 71, 67–83.
- [117] E. Doehring, H. Feldmeier, A. A. Dafalla et al., *J. Infectious Dis.* **1984**, 149, 615–620.
- [118] I. Nordgren, M. Bergström, B. Holmstedt et al., *Arch. Toxicol* **1978**, 41, 31–41.
- [119] K. Pallitsch, A. Roller, F. Hammerschmidt, *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 10200–10206.
- [120] M. A. Raskind, P. A. Cyrus, B. B. Ruzicka et al., *J. Clin. Psychiatry* **1999**, 60, 318–325.
- [121] J. M. López-Arrieta, L. Schneider, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, 2, CD003155.
- [122] W. Hofer, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **2009**, 49, 7–14.
- [123] D. A. Denham, R. J. Holdsworth, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1971**, 65, 696.
- [124] A. Bloom, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **2009**, 49, 109–113.
- [125] H. P. Striebel, *Experientia* **1976**, 32, 457–458.
- [126] M. Voge, E. Bueding, *Exp. Parasitol.* **1980**, 50, 251–259.
- [127] B. Leitch, A. J. Probert, *Exp. Parasitol.* **1984**, 58, 278–289.
- [128] R. D. Walter, E. Albiez, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, 16, 109–115.
- [129] F. W. Tischendorf, N. W. Brattig, A. Hoyer et al., *Acta Trop.* **1993**, 53, 27–37.
- [130] Y. H. Liu, Q. N. Wang, X. G. Wang et al., *Chin. Med. J. (Engl).* **1983**, 96, 269–274.
- [131] P. Köhler, K. P. Davies, H. Zahner, *Acta Trop.* **1992**, 51, 195–211.
- [132] R. P. Batzinger, E. Bueding, H. Popper, *Hepatology* **1981**, 1, 21–27.
- [133] WHO, “World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List,” can be found under <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>, April 8, 2020.
- [134] R. Foster, E. T. Mesmer, B. L. Cheetham et al., *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1971**, 65, 221–232.
- [135] R. Foster, B. L. Cheetham, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1973**, 67, 674–684.
- [136] R. Foster, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**, 81, 55–59.
- [137] W. Kikuth, R. Gönnert, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1948**, 42, 256–267.
- [138] D. Rosi, G. Peruzzotti, E. W. Dennis et al., *Nature* **1965**, 208, 1005–1006.

- [139] D. A. Berberian, H. Freele, *J. Parasitol.* **1964**, *50*, 435–440.
- [140] P. E. Hartman, K. Levine, Z. Hartman et al., *Science* **1971**, *172*, 1058–1060.
- [141] J. A. Moore, *Nature* **1972**, *239*, 107–109.
- [142] E. B. W. H. Haese, D. L. Smith, *Pharmacol. Res. Perspect.* **1973**, *186*, 430–440.
- [143] R. Gönnert, *Bull. World Health Organ.* **1961**, *25*, 702–706.
- [144] H. C. Richards, R. Foster, *Nature* **1969**, *222*, 581–582.
- [145] L. Pica-Mattoccia, D. Cioli, S. Archer, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1989**, *83*, 373–376.
- [146] L. Pica-Mattoccia, D. Carlini, A. Guidi et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 307–312.
- [147] C. L. L. Valentim, D. Cioli, F. D. Chevalier et al., *Science* **2013**, *342*, 1385–1389.
- [148] A. R. Rugel, M. A. Guzman, A. B. Taylor et al., *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2020**, *13*, 8–15.
- [149] V. B. R. da Silva, B. R. K. L. Campos, J. F. de Oliveira et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3259–3277.
- [150] A. B. Taylor, L. Pica-Mattoccia, C. M. Polcaro et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004132.
- [151] D. Cioli, L. Pica-Mattoccia, S. Archer, *Parasitol. Today* **1993**, *9*, 162–166.
- [152] J. Seubert, R. Pohlke, F. Loebich, *Experientia* **1977**, *33*, 1036–1037.
- [153] R. Gönnert, P. Andrews, *Zeitschrift für Parasitenkd.* **1977**, *52*, 129–150.
- [154] P. Andrews, *Arzneimittelforschung.* **1981**, *31*, 538–541.
- [155] E. Groll, *Adv. Pharmacol.* **1984**, *20*, 219–238.
- [156] D. H. Wegner, *Arzneimittelforschung.* **1984**, *34*, 1132–1136.
- [157] G. Webbe, C. James, *Zeitschrift für Parasitenkd.* **1977**, *52*, 169–177.
- [158] S. Xiao, B. A. Cattot, L. T. Webster, *J. Infectious Dis.* **1985**, *151*, 1130–1137.
- [159] L. Pica-Mattoccia, D. Cioli, *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 527–533.
- [160] P. Andrews, H. Thomas, R. Pohlke et al., *Med. Res. Rev.* **1983**, *3*, 147–200.
- [161] H. Thomas, R. Gönnert, *Zeitschrift für Parasitenkd.* **1977**, *52*, 117–127.
- [162] M. A. Gemmell, P. D. Johnstone, *Antibiot. Chemother.* **1981**, *30*, 54–114.
- [163] P. Bouree, *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **1991**, *21*, 303–307.
- [164] H. Bartsch, T. Kuroki, C. Malaveille et al., *Mutat. Res. Toxicol.* **1978**, *58*, 133–142.
- [165] H. Frohberg, *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* **1984**, *34*, 1137–1144.
- [166] H. Frohberg, *Acta Leiden.* **1989**, *57*, 201–215.
- [167] P. G. N. Kramers, J. M. Gentile, B. J. A. M. Gryseels et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **1991**, *257*, 49–89.
- [168] A. D. Dayan, *Acta Trop.* **2003**, *86*, 141–159.
- [169] O. F. Jaoko WG, Muchemi G, *East Afr. Med. J.* **1996**, *73*, 499–501.
- [170] N. Berhe, S. G. Gundersen, F. Abebe et al., *Acta Trop.* **1999**, *72*, 53–63.
- [171] S. H. Xiao, B. A. Catto, *J. Infect. Dis.* **1989**, *159*, 589–592.
- [172] U. Staudt, G. Schmahl, G. Blaschke et al., *Parasitol. Res.* **1992**, *78*, 392–397.
- [173] F. Westhoff, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1992**, *578*, 265–271.
- [174] C. J. Chavasse, M. C. Brown, D. R. Bell, *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* **1979**, *58*, 169–174.

- [175] R. H. Fetterer, R. A. Pax, J. L. Bennett, *Eur. J. Pharmacol.* **1980**, 64, 31–38.
- [176] R. Pax, J. L. Bennett, R. Fetterer, *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **1978**, 304, 309–315.
- [177] T. A. Day, J. L. Bennett, R. A. Pax, *Parasitol. Today* **1992**, 8, 342–344.
- [178] C. A. Redman, A. Robertson, P. G. Fallon et al., *Parasitol. Today* **1996**, 12, 14–20.
- [179] A. Harder, J. Goossens, P. Andrews, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1988**, 29, 55–59.
- [180] S. F. Lima, L. Q. Vieira, A. Harder et al., *Parasitology* **1994**, 109, 57–64.
- [181] V. Salvador-Recatalà, T. Schneider, R. M. Greenberg, *BMC Physiol.* **2008**, 8 (6).
- [182] W. A. Catterall, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, 16, 521–555.
- [183] A. B. Kohn, P. A. Anderson, J. M. Roberts-Misterly et al., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 36873–36876.
- [184] R. M. Greenberg, *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 1–9.
- [185] R. M. Greenberg, *Parasitology* **2005**, 131, 97–108.
- [186] M. C. Jeziorski, R. M. Greenberg, *Int. J. Parasitol.* **2006**, 36, 625–632.
- [187] V. Salvador-Recatalà, R. M. Greenberg, *WIREs Membr. Transp. Signal* **2012**, 1, 85–93.
- [188] F. Noël, V. M. Cunha, C. L. Silva et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2001**, 96, 85–88.
- [189] Y. Matsumoto, G. Perry, R. J. C. Levine et al., *Nature* **1988**, 333, 76–78.
- [190] M. Gnanasekar, A. M. Salunkhe, A. K. Mallia et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 1054–1060.
- [191] S. K. Park, G. S. Gunaratne, E. G. Chulkov et al., *J. Biol. Chem.* **2019**, 294, 18873–18880.
- [192] L. Pica-Mattoccia, C. Valle, A. Basso et al., *Exp. Parasitol.* **2007**, 115, 344–351.
- [193] B. Becker, H. Mehlhorn, P. Andrews et al., *Zeitschrift für Parasitenkd.* **1980**, 63, 113–128.
- [194] H. Mehlhorn, B. Becker, P. Andrews et al., *Arzneimittelforschung.* **1981**, 31, 544–554.
- [195] J. Portela, J. Boissier, B. Gourbal et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, 6, e1474.
- [196] W. Harnett, J. R. Kusel, *Parasitology* **1986**, 93, 401–405.
- [197] P. J. Brindley, M. Strand, A. P. Norden et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, 34, 99–108.
- [198] A. A. Sabah, C. Fletcher, G. Webbe et al., *Exp. Parasitol.* **1985**, 60, 348–354.
- [199] A. Hohaus, Interaktionen der  $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals mit der ionenleitenden  $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit und dem riesenprotein Ahnak: Funktionelle Analyse und Charakterisierung von Bindungsdomänen, Freie Universität Berlin, Dissertation, **2002**.
- [200] J. D. Chan, P. M. Cupit, G. S. Gunaratne et al., *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1–7.
- [201] P. Andrews, *Pharmacol. Ther.* **1985**, 29, 129–156.
- [202] A. Harder, J. Abbink, P. Andrews et al., *Parasitol. Res.* **1987**, 73, 442–445.
- [203] F. Angelucci, A. Basso, A. Bellelli et al., *Parasitology* **2007**, 134, 1215–1221.
- [204] P. M. Vanhoutte, *Int. J. Cardiol.* **1987**, 14, 189–203.
- [205] S. W. Watts, S. F. Morrison, R. P. Davis et al., *Pharmacol. Rev.* **2012**, 64, 359–388.
- [206] P. G. Fallon, M. J. Doenhoff, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1994**, 51, 83–88.
- [207] M. M. Ismail, S. A. Taha, A. M. Farghaly et al., *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **1994**, 24, 685–95.
- [208] P. G. Fallon, L. F. Tao, M. M. Ismail et al., *Parasitol. Today* **1996**, 12, 316–320.
- [209] P. G. Fallon, *Drug Resist. Updat.* **1998**, 1, 236–241.

- [210] F. F. Stelma, I. Talla, S. Sow et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *53*, 167–170.
- [211] L. van Lieshout, F. F. Stelma, F. Guissé et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *61*, 760–765.
- [212] A. Danso-Appiah, S. J. De Vlas, *Trends Parasitol.* **2002**, *18*, 125–129.
- [213] M. Ismail, A. Metwally, A. Farghaly et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 214–218.
- [214] M. J. Doenhoff, J. R. Kusel, G. C. Coles et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 465–469.
- [215] N. Katz, R. S. Rocha, C. P. De Souza et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *44*, 509–512.
- [216] B. L. Herwaldt, L. Tao, W. van Pelt et al., *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *20*, 309–315.
- [217] S. D. Lawn, S. B. Lucas, P. L. Chiodini, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *97*, 100–101.
- [218] I. M. Da Silva, R. Thiengo, M. J. Conceição et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 445–449.
- [219] D. Alonso, J. Muñoz, J. Gascón et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 342–344.
- [220] I. M. Da Silva, E. Pereira Filho, R. Thiengo et al., *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2008**, *50*, 343–346.
- [221] S. D. Melman, M. L. Steinauer, C. Cunningham et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e504.
- [222] E. Y. W. Seto, B. K. Wong, D. Lu et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 74–82.
- [223] D. Cioli, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2000**, *13*, 659–663.
- [224] B. Gryseels, A. Mbaye, S. J. De Vlas et al., *Trop. Med. Int. Heal.* **2001**, *6*, 864–873.
- [225] R. Bergquist, J. Utzinger, J. Keiser, *Infect. Dis. Poverty* **2017**, *6*, 1–10.
- [226] C. A. Homewood, J. M. Jewsbury, M. L. Chance, *Comp. Biochem. Physiol.* **1972**, *43B*, 517–523.
- [227] M. M. Chen, L. Shi, D. J. Sullivan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *113*, 1–8.
- [228] J. Q. You, J. Y. Mei, S. H. Xiao, *Acta Pharmacol. Sin.* **1992**, *13*, 280–284.
- [229] S. H. Xiao, B. A. Catto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1557–1562.
- [230] X. Shuhua, J. Utzinger, J. Chollet et al., *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1001–1006.
- [231] J. Utzinger, J. Chollet, Z. Tu et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 318–323.
- [232] J. Utzinger, J. Chollet, Y. Jiqing et al., *Acta Trop.* **2001**, *80*, 9–18.
- [233] D. Clercq, J. Vercruysse, P. Verle et al., *Trop. Med. Int. Heal.* **2000**, *5*, 744–746.
- [234] Y. S. Li, H. G. Chen, H. Bin He et al., *Acta Trop.* **2005**, *96*, 184–190.
- [235] J. Utzinger, E. K. N’Goran, A. N’Dri et al., *Lancet* **2000**, *355*, 1320–1325.
- [236] D. De Clercq, J. Vercruysse, P. Verlé et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 90–91.
- [237] J. Utzinger, M. Tanner, J. Keiser, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 579–581.
- [238] C. O. Obonyo, E. M. O. Muok, P. N. M. Mwinzi, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 603–611.
- [239] A. Robert, F. Benoit-Vical, C. Claparols et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13676–13680.
- [240] B. Meunier, A. Robert, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1444–1451.
- [241] M. Schlitzer, *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, *38*, 512–520.
- [242] J. Keiser, J. Chollet, S.-H. Xiao et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e350.
- [243] S. H. Xiao, J. Xue, B. Shen, *Parasitol. Res.* **2010**, *106*, 1179–1187.
- [244] N. M. El-Lakkany, S. H. S. El-Din, A.-N. A.-A. Sabra et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2011**, *106*, 814–822.
- [245] T. Manneck, Y. Hagggenmüller, J. Keiser, *Parasitology* **2010**, *137*, 85–98.

- [246] M. C. Holtfreter, M. Loebermann, S. Klammt et al., *Exp. Parasitol.* **2011**, *127*, 270–276.
- [247] V. Buchter, J. Hess, G. Gasser et al., *Parasites and Vectors* **2018**, *11* (580).
- [248] J. Hess, G. Panic, M. Patra et al., *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 645–652.
- [249] A. Rugel, R. S. Tarpley, A. Lopez et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 967–973.
- [250] W. W. Duan, S. J. Qiu, Y. Zhao et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1587–1590.
- [251] Y. Zheng, L. Dong, C. Hu et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4223–4226.
- [252] V. Pasche, B. Laleu, J. Keiser, *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 102–110.
- [253] F. Oger, F. Dubois, S. Caby et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 1079–1084.
- [254] M. Marek, S. Kannan, A.-T. Hauser et al., *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003645.
- [255] S. Kannan, J. Melesina, A.-T. Hauser et al., *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 3005–3019.
- [256] T. Heimburg, A. Chakrabarti, J. Lancelot et al., *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2423–2435.
- [257] K. Stenzel, A. Chakrabarti, J. Melesina et al., *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2017**, *350*, e1700096.
- [258] L. F. Andrade, L. A. Nahum, L. G. A. Avelar et al., *BMC Genomics* **2011**, *12* (215).
- [259] C. G. Grevelding, S. Langner, C. Dissous, *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 246–260.
- [260] C. Dissous, A. Ahier, N. Khayath, *BioEssays* **2007**, *29*, 1281–1288.
- [261] S. Beckmann, T. Quack, C. Burmeister et al., *Parasitology* **2010**, *137*, 497–520.
- [262] C. F. Waller, in *Recent Results Cancer Res. (211)*, *Small Mol. Hematol.*, Springer New York LLC, **2018**, pp. 1–27.
- [263] S. Beckmann, C. G. Grevelding, *Int. J. Parasitol.* **2010**, *40*, 521–526.
- [264] S. Beckmann, T. Long, C. Scheld et al., *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *4*, 287–295.
- [265] C. Buro, S. Beckmann, K. C. Oliveira et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2923.
- [266] H. M. Alger, D. L. Williams, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *121*, 129–139.
- [267] H.-H. Huang, L. Day, C. L. Cass et al., *Biochemistry* **2011**, *50*, 5870–5882.
- [268] M. Bonilla, A. Denicola, S. M. Marino et al., *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 4959–4967.
- [269] A. F. Eweas, G. Allam, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2018**, *225*, 94–102.
- [270] A. N. Kuntz, E. Davioud-Charvet, A. A. Sayed et al., *PLoS Med.* **2007**, *4*, e206.
- [271] Y. Han, Z. Fu, Y. Hong et al., *J. Parasitol.* **2014**, *100*, 463–469.
- [272] A. Simeonov, A. Jadhav, A. A. Sayed et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e127.
- [273] A. A. Sayed, A. Simeonov, C. J. Thomas et al., *Nat. Med.* **2008**, *14*, 407–412.
- [274] G. Rai, A. A. Sayed, W. A. Lea et al., *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6474–6483.
- [275] R. G. Bell, H. W. Smith, *Can. Med. Assoc. J.* **1949**, *60*, 286–288.
- [276] O. Totmar, E. Hellström, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **2009**, *45*, 272–281.
- [277] J. L. Bennett, G. Gianutsos, *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 817–820.
- [278] R. E. Staub, S. E. Sparks, G. B. Quistad et al., *Chem. Res. Toxicol* **1995**, *8*, 1063–1069.
- [279] J. J. Lipsky, M. L. Shen, S. Naylor, *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *130–132*, 93–102.
- [280] V. Koppaka, D. C. Thompson, Y. Chen et al., *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 520–539.
- [281] M. Goldstein, E. Lauber, M. R. McKereghan, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2066–2072.

- [282] B. Cvek, Z. Dvorak, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3155–3167.
- [283] S. G. Shiah, Y. R. Kao, F. Y. H. Wu et al., *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1076–1084.
- [284] G. Hogarth, *Mini-Reviews Med. Chem.* **2012**, *12*, 1202–1215.
- [285] R. G. Berlin, *Alcohol Alcohol.* **1989**, *24*, 241–265.
- [286] P. Mäder, Synthese und biologische Testung von Biarylalkylcarbonsäure-Derivaten und Dithiocarbamat-Derivaten als potentielle anthelmintische Wirkstoffe gegen *Schistosoma mansoni*, Philipps-Universität Marburg, Dissertation, **2016**.
- [287] A. B. Reitz, G. R. Smith, M. H. Parker, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 1449–1453.
- [288] S. Mushtaq, Y. Ge, D. M. Livermore, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3086–3092.
- [289] S. J. Keam, *Drugs* **2008**, *68*, 2021–2057.
- [290] D. M. Livermore, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *63*, 455–458.
- [291] L. Mandell, *Clin. Infect. Dis. (Suppl. 1)* **2009**, *49*, S1–S3.
- [292] A. Casini, J.-Y. Winum, J.-L. Montero et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 837–840.
- [293] A. Akincioğlu, Y. Akbaba, H. Göçer et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 1379–1385.
- [294] C. T. Supuran, A. Scozzafava, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, *10*, 575–600.
- [295] C. T. Supuran, A. Scozzafava, *Curr. Med. Chem. Endocr. Metab. Agents* **2001**, *1*, 61–97.
- [296] C. T. Supuran, A. Scozzafava, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, *12*, 217–242.
- [297] K. Lee, W. H. Jung, C. W. Park et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1017–1022.
- [298] K. Lee, C. W. Park, W. H. Jung et al., *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3612–3622.
- [299] J. A. Shafer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 458–465.
- [300] P. C. A. Kam, N. Kaur, C. L. Thong, *Anaesthesia* **2005**, *60*, 565–574.
- [301] S. Srivastava, L. N. Goswami, D. K. Dikshit, *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 66–92.
- [302] J. D. Park, D. H. Kim, S. J. Kim et al., *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5295–5302.
- [303] J. D. Park, D. H. Kim, *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, *12*, 2349–2356.
- [304] M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown et al., *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2735–2776.
- [305] B. E. Maryanoff, D. F. McComsey, M. J. Costanzo et al., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1941–1947.
- [306] M. H. Parker, V. L. Smith-Swintosky, D. F. McComsey et al., *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7528–7536.
- [307] D. F. McComsey, V. L. Smith-Swintosky, M. H. Parker et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9019–9030.
- [308] B. E. Maryanoff, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3433–3440.
- [309] C. R. Ganellin, A. Ganesan, J. Proudfoot, *Standalone Drugs*, **2010**.
- [310] A. Di Fiore, G. De Simone, V. Alterio et al., *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 4853–4858.
- [311] C. A. Veale, P. R. Bernstein, C. Bryant et al., *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 98–108.
- [312] K. A. Travis J, Dubin A, Potempa J, Watorek W, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *624*, 81–86.
- [313] S. Eriksson, *Eur. Respir. J.* **1991**, *4*, 1041–1043.
- [314] M. J. Tozer, I. M. Buck, T. Cooke et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3103–3108.
- [315] R. Leurs, P. Blandina, C. Tedford et al., *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, *19*, 177–184.
- [316] E. Tiligada, E. Zampeli, K. Sander et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18*, 1519–1531.



- [317] M. Berlin, C. W. Boyce, M. De Lera Ruiz, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 26–53.
- [318] D. Dou, K. C. Tiew, S. R. Mandadapu et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20, 2111–2118.
- [319] M. Patel, M. M. Patel, A. J. Hall et al., *J. Clin. Virol.* **2009**, 44, 1–8.
- [320] R. Nordmann, T. J. Petcher, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 367–375.
- [321] R. Nordmann, A. Widmer, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1540–1542.
- [322] A. Barlier, P. Jaquet, *Eur. J. Endocrinol.* **2006**, 154, 187–195.
- [323] A. M. Doherty, I. Sircar, B. E. Kornberg et al., *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2–14.
- [324] W. C. Patt, H. W. Hamilton, M. D. Taylor et al., *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2562–2572.
- [325] T. Inagami, K. Mizuno, M. Nakamaru et al., *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1988**, 2, 453–458.
- [326] C. M. Ferrario, M. T. Schiavone, *Cleve. Clin. J. Med.* **1989**, 56, 439–446.
- [327] S. H. Rosenberg, K. W. Woods, R. G. Maki et al., *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1582–1590.
- [328] Y. Wu, C. Shi, X. Sun et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, 19, 4238–4249.
- [329] T. Sparey, D. Beher, J. Best et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4212–4216.
- [330] B. Schmidt, *ChemBioChem* **2003**, 4, 366–378.
- [331] W. P. Esler, M. S. Wolfe, *Science* **2001**, 293, 1449–1454.
- [332] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, 297, 353–356.
- [333] J. J. Chen, N. Dewdney, X. Lin et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3951–3954.
- [334] R. C. Newton, C. P. Decicco, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2295–2314.
- [335] F. C. Nelson, A. Zask, *Expert Opin. Investig. Drugs* **1999**, 8, 383–392.
- [336] J. S. Smolen, G. Steiner, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 473–488.
- [337] J. Hultén, N. M. Bonham, U. Nillroth et al., *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 885–897.
- [338] K. Bäckbro, S. Löwgren, K. Österlund et al., *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 898–902.
- [339] J. Hultén, H. O. Andersson, W. Schaal et al., *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4054–4061.
- [340] A. Spaltenstein, M. R. Almond, W. J. Bock et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1159–1162.
- [341] W. Schaal, A. Karlsson, G. Ahlsén et al., *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 155–169.
- [342] H. Yang, J. Nkeze, R. Y. Zhao, *Cell Biosci.* **2012**, 2, 1–8.
- [343] J. Konvalinka, H. G. Kräusslich, B. Müller, *Virology* **2015**, 479–480, 403–417.
- [344] J. L. Castro, R. Baker, A. R. Guiblin et al., *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3023–3032.
- [345] M. D. Ferrari, P. R. Saxena, *Cephalalgia* **1993**, 13, 151–165.
- [346] F. Hof, C. Nuckolls, S. L. Craig et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10991–10996.
- [347] B. Gong, C. Zheng, H. Zeng et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9766–9767.
- [348] S. V. Pansare, A. N. Rai, S. N. Kate, *Synlett* **1998**, 1998, 623–624.
- [349] D. Sartor, J. Saffrich, G. Helmchen et al., *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, 2, 639–642.
- [350] W. Spillane, J. B. Malaubier, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 2507–2586.
- [351] J. Y. Winum, A. Scozzafava, J. L. Montero et al., *Med. Res. Rev.* **2006**, 26, 767–792.
- [352] L. Gavernet, I. A. Barrios, M. S. Cravero et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, 15, 5604–5614.
- [353] R. Sowada, *J. für Prakt. Chemie* **1963**, 20, 310–319.

- [354] J. M. McManus, J. W. McFarland, C. F. Gekber et al., *J. Med. Chem.* **1965**, 8, 766–776.
- [355] S. D. McDermott, W. J. Spillane, *Synthesis* **1983**, 1983, 192–195.
- [356] M. Preiss, *Chem. Ber.* **1978**, 111, 1915–1921.
- [357] K. W. Wheeler, E. F. Degering, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 1242–1243.
- [358] F. Giannessi, P. Chiodi, M. Marzi et al., *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2383–2386.
- [359] G. Hamprecht, K.-H. König, G. Stubenrauch, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1981**, 20, 151–164.
- [360] G. Weiß, G. Schulze, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1969**, 729, 40–51.
- [361] T. I. Bieber, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1405–1408.
- [362] U. Jäger, W. Sundermeyer, H. Pritzkow, *Chem. Ber.* **1987**, 120, 1191–1195.
- [363] J. A. Kloek, K. L. Leschinsky, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 4028–4029.
- [364] J. W. Timberlake, W. J. Ray, E. D. Stevens et al., *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5824–5826.
- [365] A. V. Leontiev, H. V. Rasika Dias, D. M. Rudkevich, *Chem. Commun.* **2006**, 2887–2889.
- [366] J. Grundnes, S. D. Christian, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2239–2245.
- [367] D. L. A. De Faria, P. S. Santos, *Magn. Reson. Chem.* **1987**, 25, 592–593.
- [368] C. Reid, R. S. Mulliken, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3869–3874.
- [369] S. S. Barton, R. H. Pettier, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1984**, 731–736.
- [370] K. Manzel, R. Minkwitz, *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **1978**, 441, 165–174.
- [371] E. M. Burgess, H. R. Penton, E. A. Taylor, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 26–31.
- [372] K. C. Nicolaou, D. A. Longbottom, S. A. Snyder et al., *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, 41, 3866–3870.
- [373] C. Esteve, B. Vidal, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1019–1021.
- [374] J. Y. Winum, L. Toupet, V. Barragan et al., *Org. Lett.* **2001**, 3, 2241–2243.
- [375] H. Cheloufi, B. Belhani, T. S. Ouk et al., *Mol. Divers.* **2016**, 20, 399–405.
- [376] W. Boufas, N. Dupont, M. Berredjem et al., *J. Mol. Struct.* **2014**, 1074, 180–185.
- [377] L. Gavernet, J. E. Elvira, G. A. Samaja et al., *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1592–1601.
- [378] G. E. DuBois, R. A. Stephenson, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5371–5373.
- [379] G. E. DuBois, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5373–5375.
- [380] A. M. Tickner, C. Liu, E. Hild et al., *Synth. Commun.* **1994**, 24, 1631–1637.
- [381] M. L. Villalba, A. V. Enrique, J. Higgs et al., *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, 774, 55–63.
- [382] A. Borghese, L. Antoine, J. P. Van Hoeck et al., *Org. Process Res. Dev.* **2006**, 10, 770–775.
- [383] L. Ducry, S. Reinelt, P. Seiler et al., *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 2432–2447.
- [384] J. L. Montero, G. Dewynter, B. Agoh et al., *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 3091–3094.
- [385] S. Beaudoin, K. E. Kinsey, J. F. Burns, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 115–119.
- [386] G. Dewynter, M. Abdaoui, L. Toupet et al., *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8691–8694.
- [387] M. Abdaoui, G. Dewynter, J. L. Montero, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5695–5698.
- [388] G. M. Atkins, E. M. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6135–6141.
- [389] G. M. Atkins, E. M. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 4744–4745.
- [390] E. M. Burgess, W. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4386–4387.

- [391] W. J. Spillane, G. Hogan, P. McGrath, *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, 8, 610–616.
- [392] W. J. Spillane, F. A. McHugh, P. O. Burke, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 13–17.
- [393] H. Ye, R. Liu, D. Li et al., *Org. Lett.* **2013**, 15, 18–21.
- [394] Y. Y. Liang, C. M. Zhang, Z. P. Liu, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, 28, 647–651.
- [395] J. H. Tocher, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1997**, 28, 485–487.
- [396] C. Viodé, N. Bettache, N. Cenas et al., *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 549–557.
- [397] F. R. Paula, S. H. P. Serrano, L. C. Tavares, *Quim. Nova* **2009**, 32, 1013–1020.
- [398] P. Gross, R. P. Smith, *Crit. Rev. Toxicol.* **1985**, 14, 87–99.
- [399] A.-C. Macherey, P. M. Dansette, in *Pract. Med. Chem.*, Elsevier, **2015**, pp. 585–614.
- [400] M. Chin Chung, P. Longhin Bosquesi, J. Leandro dos Santos, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, 17, 3515–3526.
- [401] K. Nepali, H. Y. Lee, J. P. Liou, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 2851–2893.
- [402] H. Kappus, H. Sies, *Experientia* **1981**, 37, 1233–1241.
- [403] H. Kappus, *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35, 1–6.
- [404] V. M. Alves, E. N. Muratov, S. J. Capuzzi et al., *Green Chem.* **2016**, 18, 4348–4360.
- [405] C. Limban, D. C. Nuță, C. Chiriță et al., *Toxicol. Reports* **2018**, 5, 943–953.
- [406] S. N. J. Moreno, R. Docampo, *Environ. Health Perspect.* **1985**, 64, 199–208.
- [407] J. D. Maya, S. Bollo, L. J. Nuñez-Vergara et al., *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 999–1006.
- [408] A. Mital, *Sci. Pharm.* **2009**, 77, 497–520.
- [409] A. Zahoor, M. V. M. Lafleur, R. C. Knight et al., *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 3299–3304.
- [410] H. M. Gilles, P. S. Hoffman, *Trends Parasitol.* **2002**, 18, 95–97.
- [411] L. M. Fox, L. D. Saravolatz, *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 40, 1173–1180.
- [412] S. Patterson, S. Wyllie, *Trends Parasitol.* **2014**, 30, 289–298.
- [413] M. Gniazdowski, L. Szmigiero, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1995**, 26, 473–481.
- [414] S. J. Keam, *Drugs* **2019**, 79, 1797–1803.
- [415] R. Singh, U. Manjunatha, H. I. M. Boshoff et al., *Science* **2008**, 322, 1392–1395.
- [416] S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval et al., *PLOS Pathog.* **2016**, 12, e1005971.
- [417] G. J. Weiss, J. R. Infante, E. G. Chiorean et al., *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 2997–3004.
- [418] F. Meng, D. Bhupathi, J. D. Sun et al., *BMC Cancer* **2015**, 15 (422).
- [419] “Pankreaskrebs: Evofosfamid enttäuscht in Phase III | PZ – Pharmazeutische Zeitung,” can be found under <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/2015-12/pankreaskrebs-evofosfamid-enttaeuscht-in-phase-iii/>, June 8, 2020.
- [420] V. Makarov, G. Manina, K. Mikusova et al., *Science* **2009**, 324, 801–804.
- [421] R. Tiwari, G. C. Moraski, V. Krcň Ākák et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3539–3549.
- [422] M. C. Dubinsky, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2004**, 2, 731–743.
- [423] A. A. Patel, R. A. Swerlick, C. O. McCall, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, 55, 369–389.
- [424] R. N. Brogden, A. A. Carmine, R. C. Heel et al., *Drugs* **1982**, 24, 267–303.
- [425] W. B. Strum, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1983**, 250, 1894–1896.

- [426] M. J. Daly, B. J. Price, *Prog. Med. Chem.* **1983**, *20*, 337–368.
- [427] “FDA Requests Removal of All Ranitidine Products (Zantac) from the Market | FDA,” can be found under <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market>, June 8, 2020.
- [428] A. Gordin, S. Kaakkola, H. Teräväinen, *J Neural Transm* **2004**, *111*, 1343–1363.
- [429] V. Bonifati, G. Meco, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *81*, 1–36.
- [430] J. Najib, *Clin. Ther.* **2001**, *23*, 802–832.
- [431] A. J. Tervo, T. H. Nyrönen, T. Rönkkö et al., *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2003**, *17*, 797–810.
- [432] J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer et al., *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 952–968.
- [433] V. Nikoui, S. Ostadhad, P. Azhand et al., *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *791*, 369–376.
- [434] K. Konishi, T. Fukami, S. Gotoh et al., *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *140*, 150–160.
- [435] T. M. Xiao S., Shen B., Chollet J., Utzinger J., *J. Antimicrob. Chemother.* **1983**, *12*, 535–542.
- [436] A. A. Yunis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* **1988**, *28*, 83–100.
- [437] O. N. Kostopoulou, T. G. Kourelis, P. Mamos et al., *Open Enzym. Inhib. J.* **2011**, *4*, 1–10.
- [438] R. D. Pearson, E. L. Hewlett, *Ann. Intern. Med.* **1985**, *102*, 550–551.
- [439] W. Chen, R. A. Mook, R. T. Premont et al., *Cell. Signal.* **2018**, *41*, 89–96.
- [440] E. C. . G. J. Weinbach, *Nature* **1969**, *221*, 1016–1018.
- [441] R. L. Williamson, R. L. Metcalf, *Science* **1967**, *158*, 1694–1695.
- [442] K. G. Naber, H. Niggemann, G. Stein et al., *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14* (628).
- [443] C. Pelletier, P. Prognon, P. Bourlioux, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 707–713.
- [444] M. Gentile, A. Petrungaro, G. Uccello et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26*, 1307–1316.
- [445] A. Scheffold, B. M. C. Jebaraj, S. Stilgenbauer, *Recent Results Cancer Res.* **2018**, *212*, 215–242.
- [446] P. Ioan, E. Carosati, M. Micucci et al., *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4901–4922.
- [447] E. Carosati, P. Ioan, M. Micucci et al., *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4306–4323.
- [448] E. Fasani, D. Dondi, A. Ricci et al., *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 225–230.
- [449] B. Ramirez, Q. Bickle, F. Yousif et al., *Expert Opin. Drug Discov.* **2007**, *2*, 53–61.
- [450] J. Keiser, *Parasitology* **2010**, *137*, 589–603.
- [451] T. M. Xiao S., Shen B., Chollet J., Utzinger J., *J. Parasitol.* **2000**, *86*, 1125–1132.
- [452] J. J. Van Hellemond, K. Retra, J. F. H. M. Brouwers et al., *Int. J. Parasitol.* **2006**, *36*, 691–699.
- [453] I. Popiel, D. A. Erasmus, *Exp. Parasitol.* **1984**, *58*, 254–262.
- [454] A. M. Glauert, A. E. Butterworth, R. F. Sturrock et al., *J. Cell Sci.* **1978**, *34*, 173–192.
- [455] Roche Diagnostics GmbH, “Cell Proliferation Reagent WST-1,” can be found under <http://www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-2/J2-2.pdf>, May 24, 2020.
- [456] L. M. Yin, Y. Wei, Y. Wang et al., *Int. J. Med. Sci.* **2013**, *10*, 68–72.
- [457] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 127–152.
- [458] E. F. A. Brandon, T. M. Bosch, M. J. Deenen et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 1–10.
- [459] B. B. Knowles, C. C. Howe, D. P. Aden, *Science* **1980**, *209*, 497–499.
- [460] N. Azizi, F. Aryanasab, M. R. Saidi, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5275–5277.

- [461] A. Z. Halimehjani, H. Maleki, M. R. Saidi, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 2747–2749.
- [462] A. Ziyaei Halimehjani, M. Shakourian-Fard, M. V. Farvardin et al., *J. Mol. Struct.* **2014**, 1056–1057, 56–62.
- [463] R.-T. Li, M.-S. Cai, *Synth. Commun.* **1999**, 29, 65–71.
- [464] D. R. Chapman, L. Bauer, D. P. Waller et al., *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, 27, 2063–2068.
- [465] H. L. Asch, C. P. Read, *Exp. Parasitol.* **1975**, 38, 123–135.
- [466] P. J. Skelly, R. Pfeiffer, F. Verrey et al., *Parasitology* **1999**, 119, 569–576.
- [467] G. Krautz-Peterson, S. Camargo, K. Huggel et al., *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 21767–21775.
- [468] B. Fried, T. K. Graczyk, in *Adv. Trematode Biol.*, CRC Press, **1997**, pp. 103–105.
- [469] D. F. Detar, R. Silverstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1013–1019.
- [470] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.* **1981**, 81, 589–636.
- [471] M. Bodanszky, Y. S. Klausner, A. Bodanszky, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 1507–1508.
- [472] N. L. Benoiton, F. M. F. Chen, *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 384–389.
- [473] J. Jones, *The Chemical Synthesis of Peptides. International Series of Monographs on Chemistry*, Oxford Science Publications Clarendon Press, **1991**.
- [474] D. E. Dorman, F. A. Bovey, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 2379–2383.
- [475] S. Fischer, M. Karplus, R. L. Dunbrack, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11931–11937.
- [476] V. Y. Torbeev, E. Fumi, M.-O. Ebert et al., *Helv. Chim. Acta* **2012**, 95, 2411–2420.
- [477] U. Reimer, G. Scherer, M. Drewello et al., *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 449–460.
- [478] G. Fischer, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 119–127.
- [479] S. S. Nofal Z. M. ; El Zahar, M. I.; Salem, M. A. I.; Madkour, H. M. F.; Abdel Karim, *Egypt. J. Chem* **2005**, 48, 587–604.
- [480] A. E. K. S. S. Nofal Z. M., El Zahar M. I., *Egypt J. Chem.* **2008**, 51, 91–105.
- [481] M. I. El-Zahar, S. S. A. El-Karim, *Egypt. Pharm. J.* **2012**, 11, 1–15.
- [482] S. L. McGovern, B. K. Shoichet, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1478–1483.
- [483] M. F. Sassano, A. K. Doak, B. L. Roth et al., *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2406–2414.
- [484] W. Hanefeld, Z. Enis Günes, *Arch. Pharm.* **1986**, 319, 1064–1072.
- [485] P. D. Ziniel, B. Karumudi, A. H. Barnard et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, 9, e0004279.
- [486] M. F. Eerland, C. Hedberg, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 2047–2052.
- [487] G. P. Baker, I. A. Bourne, M. J. Ford et al., *Org. Process Res. Dev.* **1999**, 3, 104–108.
- [488] D. Merricks, P. G. Sammes, R. E. R. H. Walker et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 2169–2176.
- [489] W. J. Moree, L. C. van Gent, G. A. van der Marel et al., *Tetrahedron* **1993**, 49, 1133–1150.
- [490] S. Paik, E. H. White, *Tetrahedron* **1996**, 52, 5303–5318.
- [491] D. B. . de Bont, G. D. . Dijkstra, J. A. . den Hartog et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 3035–3040.
- [492] A. J. Brouwer, M. C. F. Monnee, R. M. J. Liskamp, *Synthesis* **2000**, 11, 1579–1584.
- [493] T. M. Gabbasov, E. M. Tsyrlina, L. V. Spirikhin et al., *Chem. Nat. Compd.* **2018**, 54, 951–955.
- [494] J. L. Díaz, R. Cuberes, J. Berrocal et al., *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8211–8224.

- [495] G. Leszczynska, P. Leonczak, A. Dziergowska et al., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2013**, 32, 599–616.
- [496] J. Humljan, S. Gobec, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 4069–4072.
- [497] C. Giordano, G. Lucente, A. Masi et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, 14, 2642–2652.
- [498] A. Barco, S. Benetti, G. R. Pollini et al., *Synth.* **1974**, 1974, 877–878.
- [499] G. Blotny, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1499–1501.
- [500] M. R. Patel, A. Bhatt, J. D. Steffen et al., *J. Med. Chem* **2014**, 57, 5579–5601.
- [501] A. C. Giddens, S. A. Gamage, J. D. Kendall et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 1529–1545.
- [502] M. R. V. Finlay, D. G. Acton, D. M. Andrews et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 4442–4446.
- [503] I. Pergament, M. Srebnik, *Org. Lett.* **2001**, 3, 217–219.
- [504] P. Dupau, R. Epple, A. A. Thomas et al., *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 421–433.
- [505] A. S. Avakyan, S. O. Vartanyan, A. Markaryan et al., *Pharm. Chem. J.* **1997**, 31, 178–181.
- [506] X. Ning, Y. Guo, X. Ma et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, 21, 5589–5597.
- [507] M.-H. Abdulla, K.-C. Lim, M. Sajid et al., *PLoS Med.* **2007**, 4, e14.
- [508] A. Jílková, P. Řezáčová, M. Lepšík et al., *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 35770–35781.
- [509] B. Cherfaoui, T. K. Guo, H. P. Sun et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, 24, 2423–2432.
- [510] T. Aoki, I. Hyohdoh, N. Furuichi et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 6223–6227.
- [511] J. H. Jun, V. Kumar, T. S. Dexheimer et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, 111, 337–348.
- [512] R. De Marco, M. L. Di Gioia, A. Leggio et al., *Amino Acids* **2010**, 38, 691–700.
- [513] T. P. Zabawa, D. Kasi, S. R. Chemler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11250–11251.
- [514] T. P. Zabawa, S. R. Chemler, *Org. Lett.* **2007**, 9, 2035–2038.
- [515] H. T. Yang, X. W. Lu, M. L. Xing et al., *Org. Lett.* **2014**, 16, 5882–5885.
- [516] J. Sun, Y. Niu, C. Wang et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, 24, 3472–3482.
- [517] T. Shimada, A. Tamaki, H. Nakai et al., *Electrochemistry* **2007**, 75, 45–49.
- [518] H. H. Szmant, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1968**, 7, 120–128.
- [519] R. Fu, W. J. Hao, Y. N. Wu et al., *Org. Chem. Front.* **2016**, 3, 1452–1456.
- [520] E. S. Lazer, C. K. Miao, H.-C. Wong et al., *J. Med. Chem* **1994**, 37, 913–923.
- [521] T.-C. Zheng, D. E. Richardson, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 833–836.
- [522] Y. Wu, X. Ding, L. Ding et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 158, 247–258.
- [523] S. K. Adas, V. Bharadwaj, Y. Zhou et al., *Chem. – A Eur. J.* **2018**, 24, 7330–7334.
- [524] M. P. Sherman, W. R. Grither, R. D. McCulla, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4014–4024.
- [525] C. L. Bianco, J. P. Toscano, M. D. Bartberger et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, 617, 129–136.
- [526] M. Klüppel, Synthese und *in-vitro*-Testung von Piperazin-Derivaten gegen *Schistosoma mansoni*, Philipps-Universität Marburg, Masterarbeit, **2019**.
- [527] T. Reuillon, A. Bertoli, R. J. Griffin et al., *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 7610–7617.
- [528] J. Albaneze-Walker, R. Raju, J. A. Vance et al., *Org. Lett.* **2006**, 106, 1463–1466.
- [529] S. J. Shirbin, B. A. Boughton, S. C. Zammit et al., *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2971–2974.

- [530] B. Yang, Z. Sun, C. Liu et al., *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 6658–6661.
- [531] U. Lücking, *Angew. Chemie* **2013**, 125, 9570–9580.
- [532] A. Ammazalorso, B. De Filippis, L. Giampietro et al., *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, 90, 1094–1105.
- [533] K. Ingram-Sieber, N. Cowan, G. Panic et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, 8, e2610.
- [534] N. Cowan, P. Dätwyler, B. Ernst et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59, 1935–1941.
- [535] H. Yao, F. Liu, J. Chen et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 1386–1390.
- [536] J. Wu, C. Wang, D. Leas et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, 28, 244–248.
- [537] J. M. Keith, R. Apodaca, M. Tichenor et al., *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 823–827.
- [538] P. Müller, K. Wagner, R. Müller et al., *Angew. Makromol. Chemie* **1977**, 65, 23–39.
- [539] K. Otrubova, V. Srinivasan, D. L. Boger, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 3807–3813.
- [540] B. B. Snider, S. M. O'Hare, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2455–2458.
- [541] N. Aoyagi, T. Endo, *Synth. Commun.* **2017**, 47, 442–448.
- [542] C. J. Marmion, J. P. Parker, K. B. Nolan, *Compr. Inorg. Chem. II* **2013**, 3, 683–708.
- [543] G. N. Khitrich, I. I. Seifullina, A. V. Vologzhanina, *Mendeleev Commun.* **2010**, 20, 180–181.
- [544] S. E. Wheeler, K. N. Houk, *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 2301–2312.
- [545] M. V. Westphal, B. T. Wolfstädter, J. M. Plancher et al., *ChemMedChem* **2015**, 10, 461–469.
- [546] C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger et al., *J. Med. Chem.* **1973**, 16, 1207–1216.
- [547] W. A. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 3072–3076.
- [548] W. A. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 2410–2420.
- [549] C. J. Byrne, D. A. R. Happer, M. P. Hartshorn et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1987**, 1649–1653.
- [550] J. Shorter, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 2497–2510.
- [551] M. F. Sowaileh, R. A. Hazlitt, D. A. Colby, *ChemMedChem* **2017**, 12, 1481–1490.
- [552] K. Matsuzaki, K. Okuyama, E. Tokunaga et al., *Org. Lett.* **2015**, 17, 3038–3041.
- [553] X. Mu, J. C. Axtell, N. A. Bernier et al., *Chem* **2019**, 5, 2461–2469.
- [554] T. Lebleu, J. F. Paquin, *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 442–444.
- [555] S. Yao, H. Y. Ahn, X. Wang et al., *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3965–3974.
- [556] A. A. Kolomeitsev, V. N. Movchun, N. V. Kondratenko et al., *Synthesis* **1990**, 1990, 1151–1152.
- [557] C. Goumont, R. Faucher, N. Moutiers, G. Tordeux, M. Wakselman, *Synthesis* **1997**, 6, 691–695.
- [558] S. R. Inglis, E. C. Y. Woon, A. L. Thompson et al., *J. Org. Chem* **2010**, 75, 468–471.
- [559] J. M. Jegu, B. Carboni, M. Vaultier, *J. Organomet. Chem.* **1992**, 435, 1–8.
- [560] S. J. Coutts, J. Adams, D. Krolikowski et al., *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5109–5112.
- [561] S. P. A. Hinkes, C. D. P. Klein, *Org. Lett.* **2019**, 21, 3048–3052.
- [562] J. Peiró Cadahía, V. Previtali, N. S. Troelsen et al., *Medchemcomm* **2019**, 10, 1531–1549.
- [563] S. Daum, J. Toms, V. Reshetnikov et al., *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30, 1077–1086.
- [564] C. M. Consulting, “Bioisosteric Replacements,” can be found under <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/bioisoteres/>, July 12, 2020.

- [565] P. Y. F. Deghati, A. Borghini, A. M. C. H. van den Nieuwendijk et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2003**, *11*, 899–908.
- [566] N. J. Dickson, L. K. Dyll, *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 91–99.
- [567] L. K. Dyll, *Aust. J. Chem.* **1986**, *39*, 89–101.
- [568] S. Murata, H. Tomioka, *Chem. Lett.* **1992**, 57–60.
- [569] I. R. Dunkin, N. Henderson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1178–1179.
- [570] J. H. Boyer, S. E. Ellzey, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4684–4685.
- [571] D. Destro, S. Sanchez, M. Cortigiani et al., *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5227–5235.
- [572] K. C. Nicolaou, Y. Wang, M. Lu et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8235–8246.
- [573] H. K. Neudeck, *Monatshefte für Chemie* **1996**, *127*, 201–217.
- [574] S. Hayat, Atta-ur-Rahman, M. I. Choudhary et al., *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1647–1649.
- [575] A. Rodríguez-Rodríguez, Z. Halime, L. M. P. Lima et al., *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 619–632.
- [576] R. G. Jones, C. Ainsworth, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1538–1540.
- [577] A. Aspatwar, N. K. Parvathaneni, H. Barker et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 109–117.
- [578] L. Kumar, A. Sarswat, N. Lal et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 817–824.
- [579] Q. R. Du, D. D. Li, Y. Z. Pi et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 2286–2297.
- [580] S. Emami, N. Shahrokhira, A. Foroumadi et al., *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 5940–5947.
- [581] P. Pimviriyakul, P. Surawatanawong, P. Chaiken, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7468–7482.
- [582] L. Han, C. Liu, W. Zhang et al., *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1231–1233.
- [583] N. Netz, T. Opatz, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1723–1730.
- [584] R. Deprez-Poulain, B. Deprez, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *4*, 569–580.
- [585] G. M. Keseru, G. M. Makara, *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 741–748.
- [586] J. P. Hughes, S. S. Rees, S. B. Kalindjian et al., *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1239–1249.
- [587] L. Hoffer, C. Muller, P. Roche et al., *Mol. Inform.* **2018**, *37* (180005).
- [588] J. R. Machado-Silva, M. Pelajo-Machado, H. L. Lenzi et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1998**, *93*, 303–307.
- [589] J. P. Robinson, *Methods Cell Biol.* **2001**, 89–106.
- [590] F. Depypere, P. Van Oostveldt, J. Timmerman et al., The Use of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) to Quantify Microcapsule Film Coating Quality, XIVth International Workshop on Bioencapsulation, **2006**.
- [591] A. S. Blohm, P. Mäder, T. Quack et al., *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 3831–3842.
- [592] J. Kellershohn, L. Thomas, S. R. Hahnel et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007240.
- [593] G. P. Morris, *Experientia* **1968**, *24*, 480–482.
- [594] B. J. Bogitsh, *Trans Am Microsc Soc.* **1975**, *94*, 524–528.
- [595] P. J. Skelly, A. A. Da'dara, X.-H. Li et al., *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004246.
- [596] S. S. K. Nawaratna, D. P. McManus, L. Moertel et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1043.
- [597] R. A. Wilson, *Protoplasma* **2012**, *249*, 503–518.
- [598] M. Sajid, J. H. McKerrow, E. Hansell et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *131*, 65–75.



- [599] J. P. Dalton, P. J. Brindley, *Parasitol. Today* **1996**, 12, 125.
- [600] R. I. Brinkworth, P. Prociv, A. Loukas et al., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 38844–38851.
- [601] H. Mei, P. T. LoVerde, *Exp. Parasitol.* **1997**, 86, 69–78.
- [602] B. C. Figueiredo, N. R. G. Assis, S. B. Morais et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, 8, e3107.
- [603] S. L. Hall, S. Braschi, M. Truscott et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, 179, 18–29.
- [604] R. H. Neves, C. De Lamare Biolchini, J. R. Machado-Silva et al., *Parasitolgy Res.* **2005**, 95, 43–49.
- [605] J. Wang, J. J. Collins, *Int. J. Parasitol.* **2016**, 46, 405–410.
- [606] P. J. Skelly, R. Alan Wilson, *Adv. Parasitol.* **2006**, 63, 185–284.
- [607] J. P. Xu, X; Caulfield, *Eur J Cell Biol* **1992**, 57, 229–235.
- [608] F. G. C. Abath, R. C. Werhauser, *Parasite Immunol.* **1996**, 18, 15–20.
- [609] S. Braschi, R. S. Curwen, P. D. Ashton et al., *Proteomics* **2006**, 6, 1471–1482.
- [610] R. A. Rogers, R. M. Jack, S. T. Furlong, *J. Cell Sci.* **1993**, 106, 485–492.
- [611] D. Moffat, J. R. Kusel, *Parasitology* **1992**, 105, 81–89.
- [612] Z. Faghiri, P. J. Skelly, *FASEB J.* **2009**, 23, 2780–2789.
- [613] J. F. H. M. Brouwers, I. M. B. Smeenk, L. M. G. van Golde et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, 88, 175–185.
- [614] F. C. Lombardo, V. Pasche, G. Panic et al., *Nat. Protoc.* **2019**, 14, 461–481.
- [615] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.* **2017**, 7 (42717).
- [616] A. P. Li, *Drug Discov. Today* **2001**, 6, 357–366.
- [617] H. Yu, A. Adedoyin, *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 852–861.
- [618] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3–26.
- [619] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 3284–3301.
- [620] R. O. Potts, R. H. Guy, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **1992**, 9, 663–669.
- [621] R. T. Hidalgo, I. J.; Raub, T. J. ; Borchardt, *Gastroenterology* **1989**, 96, 736–749.
- [622] “Biopharmazeutische Charakterisierung von Arzneistoffen und Fertigarzneimitteln | PZ – Pharmazeutische Zeitung,” can be found under <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/inhalt-20-1999/pharm5-20-1999/>, August 31, 2020.
- [623] Y. Brito-Sánchez, Y. Marrero-Ponce, S. J. Barigye et al., *Mol. Inform.* **2015**, 34, 308–330.
- [624] A. Daina, V. Zoete, *ChemMedChem* **2016**, 11, 1117–1121.
- [625] L. Di, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, 10, 379–393.
- [626] P. F. Hollenberg, *Drug Metab. Rev.* **2002**, 34, 17–35.
- [627] S. M. Huang, J. M. Strong, L. Zhang et al., *J. Clin. Pharmacol.* **2008**, 48, 662–670.
- [628] G. Szakács, A. Váradi, C. Özvegy-Laczka et al., *Drug Discov. Today* **2008**, 13, 379–393.
- [629] F. Montanari, G. F. Ecker, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 86, 17–26.
- [630] Y. C. Martin, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3164–3170.
- [631] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 430–431.
- [632] M. D. Shultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5980–5991.
- [633] M. P. Edwards, D. A. Price, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2010**, 45, 380–391.

- [634] B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 782–786.
- [635] J. Ashby, *Environ. Mutagen.* **1985**, 7, 919–921.
- [636] J. Ashby, R. W. Tennant, *Mutat. Res. Toxicol.* **1988**, 204, 17–115.
- [637] A. P. Li, C. Lu, J. A. Brent et al., *Chem. Biol. Interact.* **1999**, 121, 17–35.
- [638] S. J. Enoch, M. T. D. Cronin, J. C. Madden et al., *QSAR Comb. Sci.* **2009**, 28, 696–708.
- [639] J. Baell, M. A. Walters, *Nature* **2014**, 513, 481–483.
- [640] D. A. Smith, L. Di, E. H. Kerns, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 929–939.
- [641] E. Raschi, V. Vasina, E. Poluzzi et al., *Pharmacol. Res.* **2008**, 57, 181–195.
- [642] R. L. T. Melissa A. Haendel, Fred Tilton, George S. Bailey, *Toxicol. Sci.* **2004**, 81, 390–400.
- [643] V. Bala, S. Jangir, D. Mandalapu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 881–886.
- [644] B. Nurpelin Saglik, Y. Özkay, Ü. Demir Özkay et al., *J. Chem.* **2014**, ID.:387309.
- [645] K. Bacharaju, S. R. Jambula, S. Sivan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3274–3277.
- [646] X. J. Wang, H. W. Xu, L. L. Guo et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3074–3077.
- [647] H. B. El-Nassan, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, 30, 308–315.
- [648] Y. Qian, G. Y. Ma, Y. Yang et al., *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, 18, 4310–4316.
- [649] E. Ghabraie, H. Moghimi, S. Balalaie et al., *J. Iran. Chem. Soc.* **2013**, 10, 725–732.
- [650] S. G. Jones, M. M. Jones, *Environ. Health Perspect.* **1984**, 54, 285–290.
- [651] J. Yang, R. Yan, A. Roy et al., *Nat. Methods* **2015**, 12, 7–8.
- [652] M. Berriman, B. J. Haas, P. T. Loverde et al., *Nature* **2009**, 460, 352–358.
- [653] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen et al., *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727–748.
- [654] S. Mas-Coma, M. D. Bargues, M. A. Valero, *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 1255–1278.
- [655] Centers for Disease Control and Prevention, “CDC - DPDx - Fascioliasis,” can be found under <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>, July 11, 2020.
- [656] M. Moazeni, A. Ahmadi, *Exp. Parasitol.* **2016**, 169, 81–89.
- [657] E. Sabourin, P. Alda, A. Vázquez et al., *Trends Parasitol.* **2018**, 34, 891–903.
- [658] C. M. Webb, M. M. Cabada, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2018**, 31, 409–414.
- [659] K. Cwiklinski, S. M. O’Neill, S. Donnelly et al., *Parasite Immunol.* **2016**, 38, 558–568.
- [660] J. M. Kelley, T. P. Elliott, T. Beddoe et al., *Trends Parasitol.* **2016**, 32, 458–469.
- [661] A. Casulli, T. F. E. Barth, F. Tamarozzi, *Trends Parasitol.* **2019**, 35, 738–739.
- [662] Centers for Disease Control and Prevention, “CDC - DPDx - Echinococcosis,” can be found under <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>, July 11, 2020.
- [663] A. Hemphill, B. Stadelmann, S. Scholl et al., *Parasitology* **2010**, 137, 569–587.
- [664] E. Brunetti, P. Kern, D. A. Vuitton, *Acta Trop.* **2010**, 114, 1–16.
- [665] T. Küster, B. Stadelmann, D. Aeschbacher et al., *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, 43, 335–342.
- [666] A. Hemphill, B. Stadelmann, R. Rufener et al., *Parasite* **2014**, 21 (70).
- [667] B. Stadelmann, S. Scholl, J. Müller et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, 65, 512–519.
- [668] B. Stadelmann, R. Rufener, D. Aeschbacher et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, 10, e0004535.

- [669] T. Küster, N. Kriegel, D. W. Boykin et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57, 3829–3835.
- [670] U. Koziol, K. Brehm, *Vet. Parasitol.* **2015**, 213, 92–102.
- [671] N. Shenoy, M. Stenson, J. Lawson et al., *Lab. Investig.* **2017**, 97, 494–497.
- [672] G. Padalino, S. Ferla, A. Brancale et al., *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2018**, 8, 559–570.
- [673] R. Sekirnik, N. R. Rose, A. Thalhammer et al., *Chem. Commun.* **2009**, 6376–6378.
- [674] R. Krieg, E. Jortzik, A. A. Goetz et al., *Nat. Commun.* **2017**, 8, Id.:14478.
- [675] M. Shaquiquzzaman, G. Verma, A. Marella et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 102, 487–529.
- [676] S. K. Srivastava, U. C. S. Yadav, A. B. M. Reddy et al., *Chem. Biol. Interact.* **2011**, 191, 330–338.
- [677] S. Bin Cho, W. S. Eum, M. J. Shin et al., *Exp. Neurobiol.* **2019**, 28, 612–627.
- [678] A. Colciago, P. Negri-Cesi, F. Celotti, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2002**, 110, 22–26.
- [679] R. Tammali, A. Saxena, S. K. Srivastava et al., *Endocrinology* **2010**, 151, 2140–2150.
- [680] E. S. Kang, K. Iwata, K. Ikami et al., *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, 50, 680–688.
- [681] P. Mäder, A. S. Blohm, T. Quack et al., *ChemMedChem* **2016**, 11, 1459–1468.
- [682] A. M. Peter Ventura, S. Haerberlein, K. Lange-Grünweller et al., *ChemMedChem* **2019**, 14, 1856–1862.
- [683] M. Eisenmann, Strukturbasiertes Wirkstoffdesign neuer Aldose-Reduktase-Inhibitoren, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation, **2007**.
- [684] C. G. Grevelding, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1995**, 71, 269–272.
- [685] C. D. Dettman, S. B. Higgins-Opitz, A. Saikoolal, *Parasitol. Res.* **1989**, 76, 183–184.
- [686] R. H. Duvall, W. B. DeWitt, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1967**, 16, 483–486.
- [687] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden et al., *Organometallics* **2010**, 29, 2176–2179.
- [688] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923–2925.

Die Fortsetzung des ersten Bandes erfolgt in einer separaten Datei. Diese enthält die Seiten 378-597 des Anhangs (**Tabellen I-IV, Veröffentlichungen, Lebenslauf, Danksagung, Eidesstattliche-Erklärung**).

## **6 Anhang**

### **Tabelle I: *In-vitro*-Testung an *S. mansoni***

**Tabelle II: Langzeit-Testung**

**Tabelle III: Inhibitor-Auswaschung**

**Tabelle IV: Schistosomula-Testung**

## **Tabelle V: Zytotoxizitätsmessungen**

weitere Quellen aus dem Experimentalteil<sup>[684–688]</sup>



## Veröffentlichungen

Die nachfolgend aufgeführten wissenschaftlichen Beiträge sind aus vorliegender Arbeit hervorgegangen.

## Publikationen

- Mäder, P., **Rennar, G. A.**, Ventura, A. M. P., Grevelding, C. G. & Schlitzer, M.;  
Chemotherapy for Fighting Schistosomiasis: Past, Present and Future;  
*ChemMedChem* 13, 2374–2389 (2018); <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800572>

## Vorträge

- Dithiocarbamates - Fighting against Schistosomiasis  
2<sup>nd</sup> Retreat of the LOEWE Centre DRUID, Schloss Rauischholzhausen, 25-26.11.2019
- Dithiocarbamates as potential Agents against Schistosomiasis  
Drug Design & Development Seminar (DDDS) of the German Society for Parasitology (DGP) & the LOEWE Center DRUID, Gießen, 26-29.03.2019
- Synthesis and *in-vitro*-Testing of Dithiocarbamates as potential Agents against Schistosomiasis  
1<sup>st</sup> Retreat of the LOEWE Centre DRUID, Schloss Rauischholzhausen, 26-27.11.2018

## Poster

- Chemistry Against Infectious Diseases  
- Phenotypic Screens and in silico Approaches -  
DRUID Frühjahrssymposium, Frankfurt a. M., 03-04.02.2020
- Targeting Infectious Diseases  
DRUID Frühjahrssymposium, Marburg, 18-19.02.2019
- Dithiocarbamate Derivatives as Novel Antischistosomal Agents  
DPhG Jahrestagung / Annual meeting, Hamburg, 02-05.10.2018
- Synthesis and *in vitro* testing of Dithiocarbamates as Novel Anthelmintic Inhibitors against Schistosomiasis  
28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, Berlin, 21-24.03.2018

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Georg Alexander Rennar
Geburtsdatum	25.06.1990
Geburtsort	Celle
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Akademische und schulische Ausbildung

seit 07/2016	<p><b>Promotionsstudium</b></p> <p>Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie</p> <p>Doktorand im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Schlitzer</p> <p>Promotionsthema:</p> <p>Antischistosomal-aktive Dithiocarbamat-Derivate unter besonderer Berücksichtigung von Nitrogruppen-Bioisosteren und der Schwefelsäurediamid-Teilstruktur - Synthese und in-vitro-Testung -“</p>
10/2013-03/2016	<p><b>Masterstudium (M. Sc. Chemie)</b></p> <p>Philipps-Universität Marburg Fachbereich Chemie</p> <p>Titel der Abschlussarbeit:</p> <p>„Synthese und in vitro Testung von Fosmidomycin-Derivaten als potenzielle Inhibitoren von Histon-Demethylasen mit Jumonji-C-Domäne“</p> <p>Schwerpunkte:</p> <p>Medizinische Chemie, Organische Chemie, Chemische Biologie</p> <p>Gesamtnote: 1,2</p>
10/2010-08/2013	<p><b>Bachelorstudium (B. Sc. Chemie)</b></p> <p>Philipps-Universität Marburg Fachbereich Chemie</p> <p>Titel der Abschlussarbeit:</p> <p>„Synthese neuer <math>\alpha</math>-Bromsulfone ausgehend von 3,3-Dibrompropionaldehyd“</p> <p>Schwerpunkt: Organische Chemie</p> <p>Gesamtnote: 2,1</p>
seit 06/2009	<p><b>Allgemeine Hochschulreife (Abitur)</b></p> <p>Kooperative Gesamtschule Neustadt a. Rbge</p> <p>Gesamtnote: 1,8</p>

## **Praktika, Lehrtätigkeit und Weiteres**

seit 07/2016

### **wissenschaftlicher Mitarbeiter**

Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie

- praktische Ausbildung und Betreuung von Auszubildenden zum Chemielaboranten
- selbständige und eigenverantwortliche Organisation des Saalpraktikums „Chemie der organischen Arznei-, Hilfs-, und Schadstoffe“ für Pharmazeuten
- praktische und theoretische Ausbildung von Pharmazie- und Chemiestudenten im Rahmen von Forschungspraktika

02/2016-03/2016

### **studentische Hilfskraft**

unterstützende Betreuung im Saalpraktikum „Chemie der organischen Arznei-, Hilfs-, u. Schadstoffe“ für Pharmazeuten

07/2009-03/2010

### **Wehrdienst**

Panzerbataillon 33, Luttmersen

Marburg, den .....

.....  
(Georg Alexander Rennar)

## Danksagung

Zum Schluss gilt es allen „Danke“ zu sagen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Schlitzer für die interessante Themenstellung sowie die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Neben der Betreuung und dem fachlichen Beistand sowie zahlreicher Diskussionen und damit verbundener Denkansätze, möchte ich mich vor allem auch für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiräume bei der Bearbeitung des Themas bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph G. Grevelding für die hervorragende Kooperation im Rahmen von DRUID sowie die Übernahme des Zweitgutachtens. Außer der Möglichkeit, die *in-vitro*-Testungen an *S. mansoni* in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, danke ich auch für seine freundliche Aufnahme.

Herrn Prof. Dr. Manfred Jung danke ich für die bereitwillige Übernahme des Drittgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Carsten Culmsee und Herrn Prof. Dr. Arnold Grünweller danke ich für die Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Dr. Kerstin Lange-Grünweller und Nina Schmidt danke ich für die Durchführung der Zytotoxizitätsmessungen.

Prof. Dr. Lundström-Stadelmann und Reto Rufener danke ich für die *in-vitro*-Testungen gegen den Parasiten *Echinococcus multilocularis*.

Dr. Simone Häberlein und Hicham Houhou danke ich für die Testungen am Leberegel *Fasciola hepatica*.

Prof. Dr. Min Hu und Xuesong Li danke ich für die Testung eines Teils meiner Verbindungen an *S. japonicum*.

Prof. Dr. Karl Hoffmann und Gilda Padalino danke ich für ein initiales Schistosomula-Screening von Fosmidomycin-Derivaten.

Dr. Thomas Spangenberg von der Firma MERCK KGaA danke ich für die weitere Profilierung ausgewählter Verbindungen.

Ein großer Dank geht außerdem an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen in der Arbeitsgruppe Schlitzer, für die Unterstützung im Laboralltag und das Miteinander. Insbesondere seien dabei vor allem die langjährigen Kollegen hervorgehoben: Eva M. Schäfer,

Dr. A. Lena Pfaff, Dr. Alejandra M. Peter Ventura, Tom L. Gallinger, Thi Lan Phuong Pham, Rolf E. Emmerich, Christin Wedra und Simone Müller. Als Teil der Gruppe gilt überdies ein besonderer Dank Frau Dr. Regina Ortmann und Herrn Reiner Müller für die zahlreichen Gespräche und fachlichen Hilfestellungen sowie wertvollen Anregungen im Labor. Ein ebenso großes Dankeschön gebührt meinen Auszubildenden Claudia Heerklotz und Luca Sardone für ihren Einsatz und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Der gesamten Arbeitsgruppe Grevelding danke ich für die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis. Ich habe mich immer sehr wohl bei Euch gefühlt. Besonders bei Dr. Simone Häberlein aber auch Dr. Thomas Quack möchte ich mich für die gute Einführung in die Welt der Schistosomen sowie die hilfreichen Ratschläge und stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Auch meinen Vertiefungspraktikanten Sonja Engel, Corinna Arend, Henning Kutzner, Alexander Kraus, Mike Pohl, Florian Koch, Valerij Talagayev und ganz besonders Rolf E. Emmerich danke ich für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit. Weiterhin danke ich allen meinen Schüler- und Wahlpflichtpraktikanten für ihre motivierte Mitarbeit.

Der Arbeitsgruppe Steinmetzer Danke ich für die Möglichkeit die analytische und präparative HPLC nutzen zu können. Insbesondere Benjamin Wenzel sei an dieser Stelle nochmals für den technischen Support gedankt.

Allen Mitarbeitern der analytischen Serviceabteilungen, ganz besonders Stefan Newel und Nina Zitzer danke ich für die stets schnelle Messung meiner zahlreichen Proben sowie der kompetenten Hilfe bei fachlichen Problemen.

Frau Spanknebel, Frau Buder, Frau Lins, Frau Schutte und in Besonderem Frau Lorek, danke ich für die Unterstützung bei der Überwindung aller bürokratischen Hürden und Hilfestellung bei jedweden Angelegenheiten sowie der Ausführung der Chemikalienbestellungen.

Meinen Korrekturlesern sei an dieser Stelle ebenfalls nochmals herzlich gedankt.

Meiner Freundin Isabell Schencking danke ich für ihr immerwährendes Verständnis, wenn ich mal wieder wenig Zeit hatte. Danke, dass du immer für mich da bist. Du hast mir täglich die Kraft gegeben, um an diesen Punkt zu gelangen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, ohne deren grenzenlose Unterstützung mein Studium sowie die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wären.

## **Eidesstattliche-Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Antischistosomal-aktive Dithiocarbamat-Derivate  
unter besonderer Berücksichtigung von Nitrogruppen-Bioisosteren  
und der Schwefelsäurediamid-Teilstruktur  
- Synthese und *in-vitro*-Testung -“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den .....

.....  
(Georg Alexander Rennar)